

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Etude de l'effet protecteur du peroxy-nitrite sur les cellules endothéliales EAhy926

Roebroek, Laura

*Award date:*  
2011

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

Facultés des Sciences

**Etude de l'effet protecteur du peroxynitrite sur les cellules  
endothéliales EAhy926**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade académique de master en biochimie et  
biologie moléculaire et cellulaire**

Laura ROEBROEK

Janvier 2011

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR  
Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Télécopie : +32(0)81.72.44.20  
E-mail : [joelle.jonet@fundp.ac.be](mailto:joelle.jonet@fundp.ac.be) - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **Etude de l'effet protecteur du peroxynitrite sur les cellules endothéliales EAhy926**

ROEBROEK Laura

### Résumé

Actuellement, les maladies cardiovasculaires constituent une des 1<sup>ères</sup> causes de décès dans le monde. Dans la littérature, le peroxynitrite est essentiellement connu pour induire de multiples dommages à l'ADN, les lipides et les protéines, mais il est aussi la cause majeure du dysfonctionnement endothélial, phénomène à la base de ces maladies cardiovasculaires. Cependant, le peroxynitrite agit également comme messenger secondaire dans la cellule, en activant des voies cytoprotectrices, telles la voie Nrf2 et l'UPR. De plus, nous avons récemment montré dans notre laboratoire que le peroxynitrite pouvait favoriser la survie des cellules endothéliales exposées à une privation en sérum. Ce mémoire avait donc pour objectif d'étudier à la fois les effets cytoprotecteurs du peroxynitrite et les mécanismes sous-jacents à ces effets et comporte 2 parties majeures. Dans la 1<sup>ère</sup> partie, nous avons essayé de mettre au point différents systèmes dits « plus physiologiques » de génération de peroxynitrite *in vitro*. Parmi les systèmes décrits pour générer du peroxynitrite, nous avons choisi l'homocystéine, l'hypoxie/réoxygénation, les LDLs oxydées et l'angiotensine-II. Nous avons suivi la génération de peroxynitrite, de manière directe ou indirecte, via les sondes HPF, H<sub>2</sub>DCFDA et via l'étude de la formation de 3-nitrotyrosines, respectivement. L'angiotensine-II combinée à un donneur de NO<sup>-</sup> semble la piste la plus intéressante. Dans la 2<sup>nde</sup> partie de ce mémoire, nous nous sommes davantage focalisés sur un système expérimental de génération de peroxynitrite antérieurement mis en place dans notre laboratoire : le SIN-1, un donneur de peroxynitrite. Nous avons confirmé les effets protecteurs du SIN-1 et nous avons essayé de comprendre les liens entre la réponse Nrf2, la réponse UPR et l'autophagie dans ces effets protecteurs, en nous focalisant sur *CHOP*, un facteur de transcription décrit comme pouvant avoir des effets pro-, mais aussi anti-apoptotiques.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire  
Janvier 2011

**Promoteur** : Prof. M. Raes

## REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, je tiens à remercier le labo URBC de m'avoir permis de réaliser ce travail. Je remercie surtout Martine Raes de m'avoir intégrée dans l'équipe Athéro, de m'avoir guidée et de s'être pleinement investie tout au long du mémoire.

Merci à Laurine de m'avoir suivie et d'avoir contribué à la réalisation de ce mémoire. Merci aux différents membres de l'URBC pour la chouette ambiance au sein du labo et plus particulièrement, à Edouard et Antoine pour leurs précieux conseils et à Manu pour son soutien et sa bonne humeur quotidienne :-D

Une toute spéciale dédicace à mes ptits collègues de bureau : Ledo, Nico, Jean-Yves, Virginie – et Isa la nouvelle recrue ;-) – pour la déconnade, l'ambiance, la solidarité, les délires,... Bref, tout ça va beaucoup me manquer ! ! !

Ensuite, j'aimerais remercier mes parents, Clem et ma « toeur » pour m'avoir soutenue dans les moments plus difficiles, encouragée et d'avoir supporté mes (nombreuses) crises de nerfs :-p. Je remercie tout particulièrement mon chtit Flo dont la présence m'est devenue indispensable : toujours là pour me rassurer, me remonter le moral ainsi que subir ma jactance maladive et mes délires biologiques :-p

Enfin, merci également aux différents membres du jury pour l'intérêt porté à ce mémoire !

THANK YOU ALL ! ! ! !

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

3-NT	3-nitrotyrosines
ACE	Angiotensin converting enzyme
Ang-II	Angiotensine-II
APS	Ammonium Persulfate
ARE	Antioxidant responsive element
ATF4	Activated transcription factor 4
ATF6	Activated transcription factor 6
AU	Acide urique
BBE	Bovine brain extract
BH <sub>4</sub>	Tétrahydrobioptérine
BSA	Bovine serum albumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHOP	CCAAT/enhancer (C/EBP) homologous protein
CMA	Chaperone-mediated autophagy
CML	Cellules musculaires lisses
cPLA2	Phospholipase A2 cytosolique
Ct	Cycle threshold
DAG	Diacylglycérol
DCFH	2,7-Dichlorodihydrofluorescéine
DHG	DMEM High Glucose (4.5 g/l)
DHR	Dihydrorhodamine 123
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DOC	Deoxycholate
DTT	Dithiotréitol
EBM	Endothelial basal medium
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EGM	Endothelial growth factor
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated degradation
FBS	Fœtal bovine serum
GA-1000	Gentamicin sulfate-amphotericin B
GADD153	Growth arrest and DNA-damage inducible gene 153
GMPc	Guanosyl monophosphate cyclique
Grp78	Glucose-regulated protein 78
Grp94	Glucose-regulated protein 94
H/R	Hypoxie-réoxygénation
H <sub>2</sub> DCFDA	2'7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
HBSS	Hank's balanced salt solution

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

HBSSc	HBSS complet
HCy	Homocystéine
HHCy	Hyperhomocystéinémie
HKG	Housekeeping gene
Hmox-1 : gène encodant HO-1	Hème oxygénase-1
HPF	2-[6-(4-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid
HPF	3'-(p-Hydroxyphenyl) Fluorescein
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
I/R	Ischémie-reperfusion
IP3	Inositol triphosphate
IRE-1	Inositol requiring enzyme-1
Keap-1	Kelch-like ECH-associated protein-1
LDL	Low density lipoprotein
Maf	Musculo aponeurotic fibrosarcoma
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MoxLDL	LDL oxydée à la myéloperoxydase
NO	Oxyde nitrique
NOS	Nitric oxide synthase
Nrf2	Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
O/N	Overnight
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
OxLDL	LDL oxydée au Cuivre (Cu <sup>++</sup> )
PARP	Poly ADP ribose polymérase
PBS	Phosphate buffered saline
PERK	Pancreatic endoplasmic reticulum kinase
PFA	Paraformaldéhyde
PIC	Protease inhibitor cocktail
PKC	Protéine kinase C
PMN	Polymorphonucléaires neutrophiles
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids
PVDF	Polyvinylidène
RE	Réticulum endoplasmique
rhEGF	Human recombinant epidermal growth factor
RISC	RNA-induced RNA silencing complex
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcription
SDS	Sodium dodecyl sulfate

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel Electrophoresis
SIN-1	3-morpholinosydnoline
SOD	Superoxide dismutase
SP	Serine-protease
T° A	Température ambiante
TBS	TRIS buffered saline
TBS-t	TRIS buffered saline + tween
TRIS	Tris(Hydroxyméthyl)aminométhane
UPR	Unfolded protein response
XBP-1	Xho-1 site-binding protein-1

# TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1. LE PEROXYNITRITE, UNE MOLECULE AU CŒUR DU DYSFONCTIONNEMENT ENDOTHELIAL</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Le peroxynitrite se forme par combinaison de l'oxyde nitrique et de l'anion superoxyde</i>	1
1.2. <i>L'oxyde nitrique et les NO synthases</i>	2
1.3. <i>L'anion superoxyde</i>	2
1.4. <i>Lien entre peroxynitrite et dysfonctionnement endothélial</i>	3
1.5. <i>Facteurs de risques cardiovasculaires favorisant le dysfonctionnement endothélial</i>	3
1.6. <i>Lien entre dysfonctionnement endothélial et athérosclérose</i>	4
<b>2. LA FORMATION DE PEROXYNITRITE</b>	<b>4</b>
2.1. <i>Production de peroxynitrite in situ</i>	4
2.2. <i>Systèmes expérimentaux de génération de peroxynitrite in vitro</i>	7
<b>3. EFFETS DU PEROXYNITRITE</b>	<b>8</b>
3.1. <i>Effets directs – Le peroxynitrite en tant que molécule toxique</i>	8
3.2. <i>Effets indirects – Le peroxynitrite en tant que messenger secondaire</i>	10
<b>4. Systèmes de détoxification du peroxynitrite</b>	<b>14</b>
4.1. <i>Molécules antioxydantes à large spectre</i>	14
4.2. <i>Acide urique</i>	14
<b>5. DETECTION DU PEROXYNITRITE</b>	<b>15</b>
5.1. <i>Détection directe de peroxynitrite</i>	15
5.2. <i>Détection indirecte de peroxynitrite par la formation de 3-NT</i>	16
<b>6. OBJECTIFS DU MEMOIRE</b>	<b>17</b>
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b>	<b>18</b>
<b>1. LIGNEES CELLULAIRES ET CULTURE</b>	<b>18</b>
1.1. <i>Repiquage des cellules</i>	18
1.2. <i>Stimulation des cellules EAhy926</i>	18
<b>2. EXTRACTION PROTEIQUE</b>	<b>19</b>
2.1. <i>Extraction avec le tampon de lyse TRIS-HCl</i>	19
2.2. <i>Extraction avec le tampon de lyse DLA</i>	19
2.3. <i>Extraction avec le tampon de lyse RIPA</i>	19
2.4. <i>Extraction avec le tampon de lyse HIF</i>	19
<b>3. DOSAGE PROTEIQUE</b>	<b>20</b>
3.1. <i>Dosage par la méthode de Bradford</i>	20
3.2. <i>Dosage par la méthode de Pierce</i>	20
<b>4. IMMUNOPRECIPITATION DES PROTEINES</b>	<b>21</b>
<b>5. WESTERN BLOT</b>	<b>21</b>
5.1. <i>Migration des échantillons</i>	22
5.2. <i>Transfert</i>	22
5.3. <i>Révélation des protéines avec le système ECL Advance (système HRP)</i>	22
<b>6. MARQUAGE IMMUNOCYTOCHIMIQUE OU IMMUNOFLUORESCENCE</b>	<b>23</b>
6.1. <i>Marquage après fixation avec du PFA</i>	23
6.2. <i>Marquage après fixation avec le mélange Méthanol-Acétone</i>	24
6.3. <i>Marquage après fixation avec le mélange Ethanol-Acide acétique</i>	24
<b>7. DETECTION DE LA GENERATION DE PEROXYNITRITE ET D'UN STRESS OXYDATIF AVEC LES SONDAS HPF ET H<sub>2</sub>DCFDA</b>	<b>24</b>
<b>8. EXTRACTION D'ARN</b>	<b>25</b>
8.1. <i>Protocole d'extraction avec le TRI-Reagent</i>	25
8.2. <i>Protocole d'extraction au QIAcube®</i>	25
<b>9. DOSAGE DE L'ARN AU NANODROP®</b>	<b>26</b>
<b>10. REVERSE TRANSCRIPTION OU RETROTRANSCRIPTION (RT)</b>	<b>26</b>
10.1. <i>RT pour analyse en Real-time RT-PCR (qRT-PCR)</i>	26
10.2. <i>RT pour analyse en carte microfluidique</i>	27
<b>11. ANALYSE DE L'ABONDANCE DES ARNM</b>	<b>27</b>
11.1. <i>Real-time RT-PCR (ou qRT-PCR)</i>	27
11.2. <i>Carte microfluidique</i>	28
<b>12. TRANSFECTION DES CELLULES AVEC DES siRNA</b>	<b>29</b>
<b>III. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>30</b>
<b>1. OPTIMISATION DES METHODES DE DETECTION DU PEROXYNITRITE</b>	<b>30</b>



# TABLE DES MATIERES

---

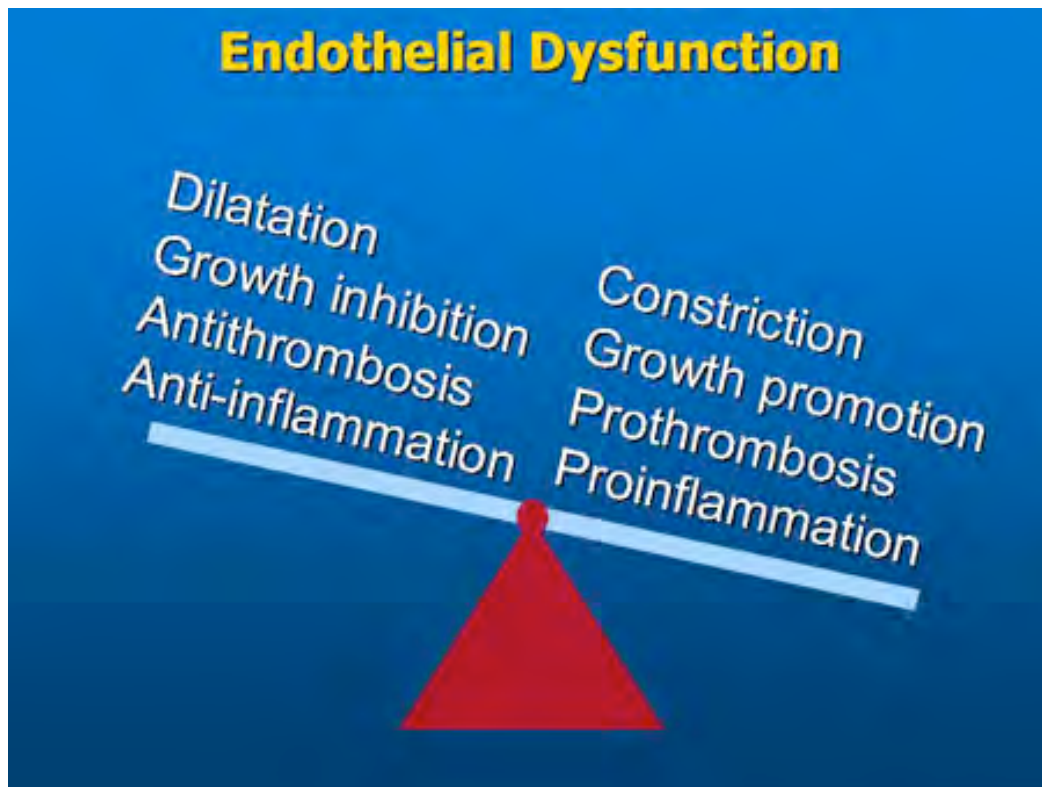
1.1. Test de sensibilité de la sonde HPF.....	30
1.2. Etude de la formation de 3-NT par immunocytochimie – Comparaison de 3 protocoles.....	31
<b>2. DEVELOPPEMENT D’UN SYSTEME EXPERIMENTAL PLUS PHYSIOLOGIQUE DE FORMATION DE PEROXYNITRITE .....</b>	<b>31</b>
2.1. Stimulation de cellules endothéliales avec l’Homocystéine (HCy).....	32
2.2. Expériences d’hypoxie et/ou de réoxygénation dans des cellules endothéliales .....	34
2.3. Mesure directe de la formation de peroxynitrite dans des cellules endothéliales stimulées avec des MOxLDLs .....	35
2.4. Stimulation de cellules endothéliales avec l’Angiotensine-II (Ang-II).....	36
<b>3. ETUDE DE L’EFFET CYTOPROTECTEUR DU PEROXYNITRITE DANS DES CELLULES ENDOTHELIALES .....</b>	<b>38</b>
3.1. Effet cytoprotecteur du peroxynitrite suite à une privation en sérum dans des cellules endothéliales..	38
3.2. Effet du peroxynitrite sur l’expression d’un ensemble de gènes impliqués dans les fonctions de la cellule endothéliale – Analyse du profil d’expression en ARNm par cartes microfluidiques.....	39
3.3. Etude de l’expression de CHOP au niveau ARNm et protéine dans des cellules endothéliales stimulées avec le SIN-1.....	40
3.3. Etude du lien entre UPR, CHOP et l’autophagie dans des cellules endothéliales stimulées avec du SIN-1	42
<b>IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>43</b>
<b>V. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>51</b>

# I. INTRODUCTION

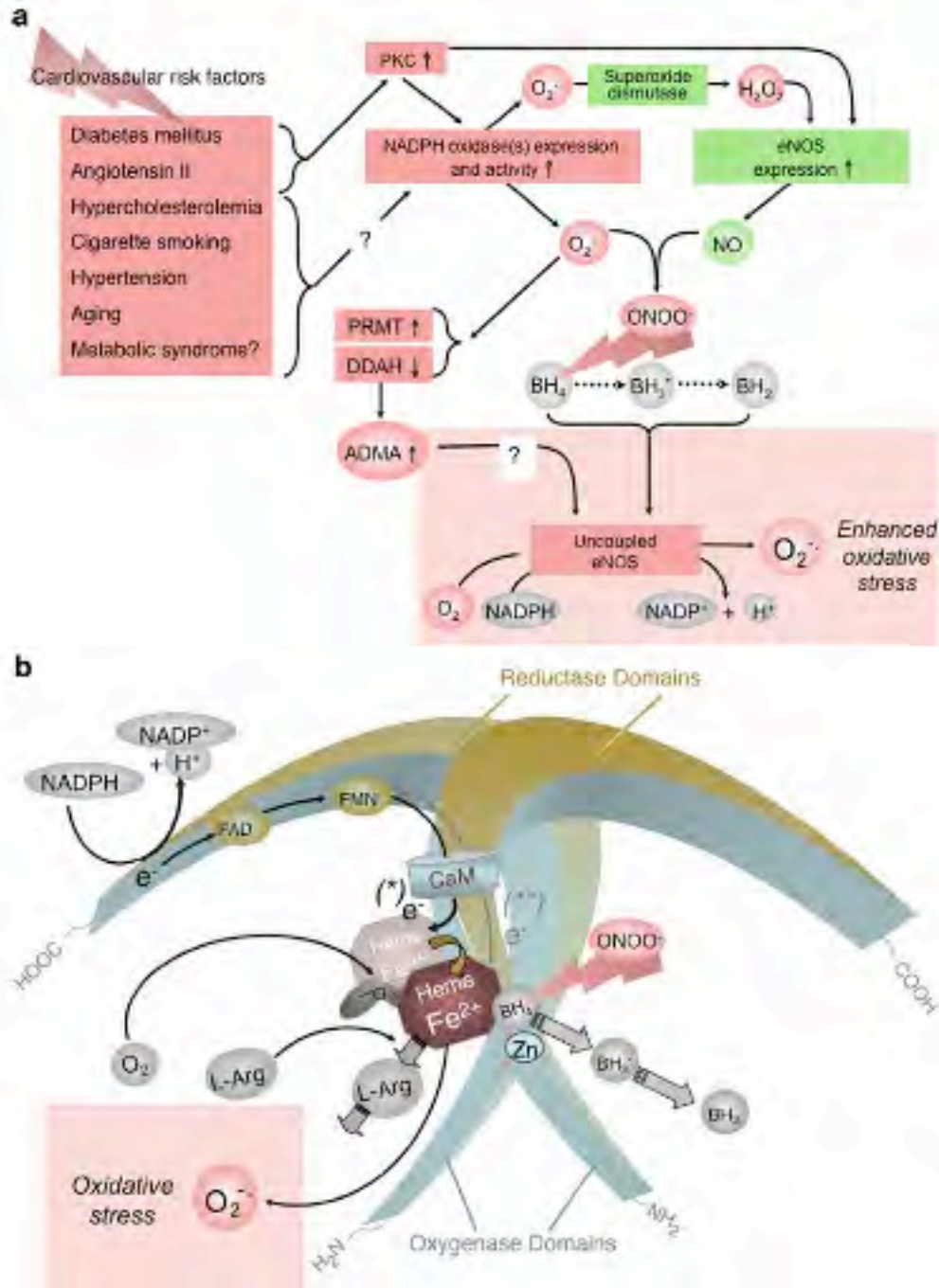


**Figure I.1. – Rôles de l'endothélium**  
<http://www.scienceandtechnology.de/page9/page9.html>

A



B



**Figure 1.2. – Le dysfonctionnement endothélial.** (A) Dérégulation des équilibres anti/proinflammatoire, anti/prothrombotique, vasorelaxation/vasoconstriction et effets anti/prolifératifs en cas de dysfonctionnement endothélial (<http://www.medscape.org/viewarticle/557238>). (B) Diminution de la biodisponibilité du NO par combinaison de ce dernier avec les ions superoxyde pour former du peroxynitrite. Celui-ci engendre le découplage de la « Nitric oxide synthase » endothéliale (eNOS), en oxydant la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), facteur essentiel à la stabilisation du dimère enzymatique. Par conséquent, la eNOS produit des anions O<sub>2</sub><sup>-</sup> (au lieu du NO), accentuant d'autant plus le stress oxydatif. Le schéma reprend aussi les principaux facteurs de risque favorisant le dysfonctionnement endothélial (Forstermann 2010).

## I. INTRODUCTION

Ce mémoire s'est attaché à l'étude des effets du peroxy-nitrite dans un modèle de cellules endothéliales en culture, car cette molécule joue un rôle clef dans le dysfonctionnement endothélial. Dans les paragraphes suivants, nous allons donc passer en revue le dysfonctionnement endothélial et le peroxy-nitrite, ainsi que décrire comment cette molécule peut être générée *in situ* et *in vitro*, et quels sont ses effets.

### 1. Le peroxy-nitrite, une molécule au cœur du dysfonctionnement endothélial

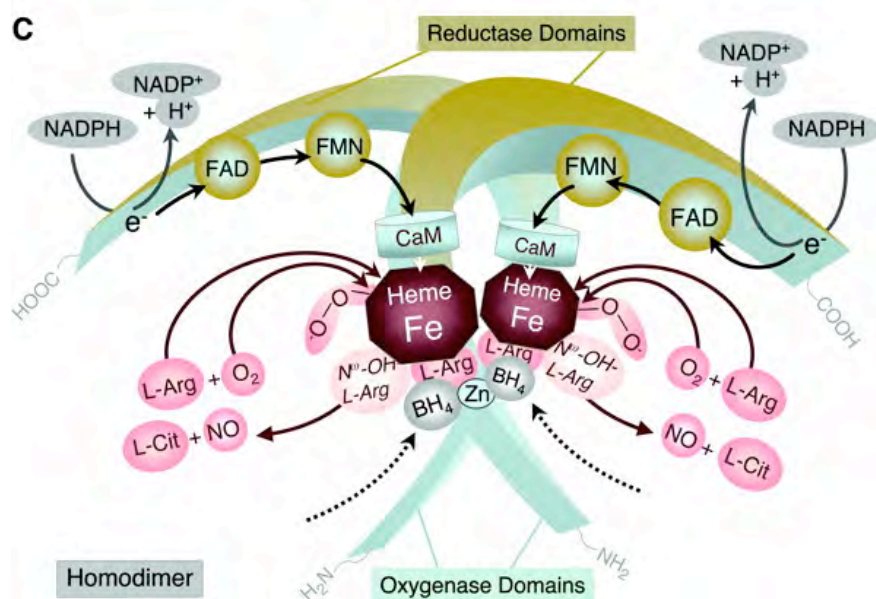
L'endothélium est un tissu bordant la paroi interne des vaisseaux sanguins et qui assure des rôles variés dans l'inflammation, la prolifération des cellules musculaires lisses, la structure et la tonicité vasculaires. En effet, l'endothélium constitue un lieu de sécrétions tant endocrines que paracrines et de communication entre divers acteurs cellulaires au sein des vaisseaux. Un endothélium sain assure l'équilibre entre la vasodilatation/vasoconstriction, des molécules pro-/anti-thrombotiques et pro-/anti-inflammatoires, l'inhibition/l'activation de la croissance cellulaire,... (**Figure I.1**). Cependant, en conditions stressantes, la perturbation de ces équilibres résulte en un dysfonctionnement endothélial (Egashira 2002). Le dysfonctionnement endothélial peut être défini comme une diminution de la biodisponibilité en oxyde nitrique (ou NO<sup>•</sup>), molécule à la fois gazeuse et radicalaire, aux propriétés vasorelaxantes bien établies. Il est impliqué dans les 1<sup>ères</sup> étapes de développement des maladies cardiovasculaires et suscite dès lors un grand intérêt (Forstermann and Munzel 2006) (**Figure I.2**). Comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants, la cause majeure de la diminution de la biodisponibilité en NO<sup>•</sup> est sa combinaison avec l'anion superoxyde, en peroxy-nitrite.

#### 1.1. Le peroxy-nitrite se forme par combinaison de l'oxyde nitrique et de l'anion superoxyde

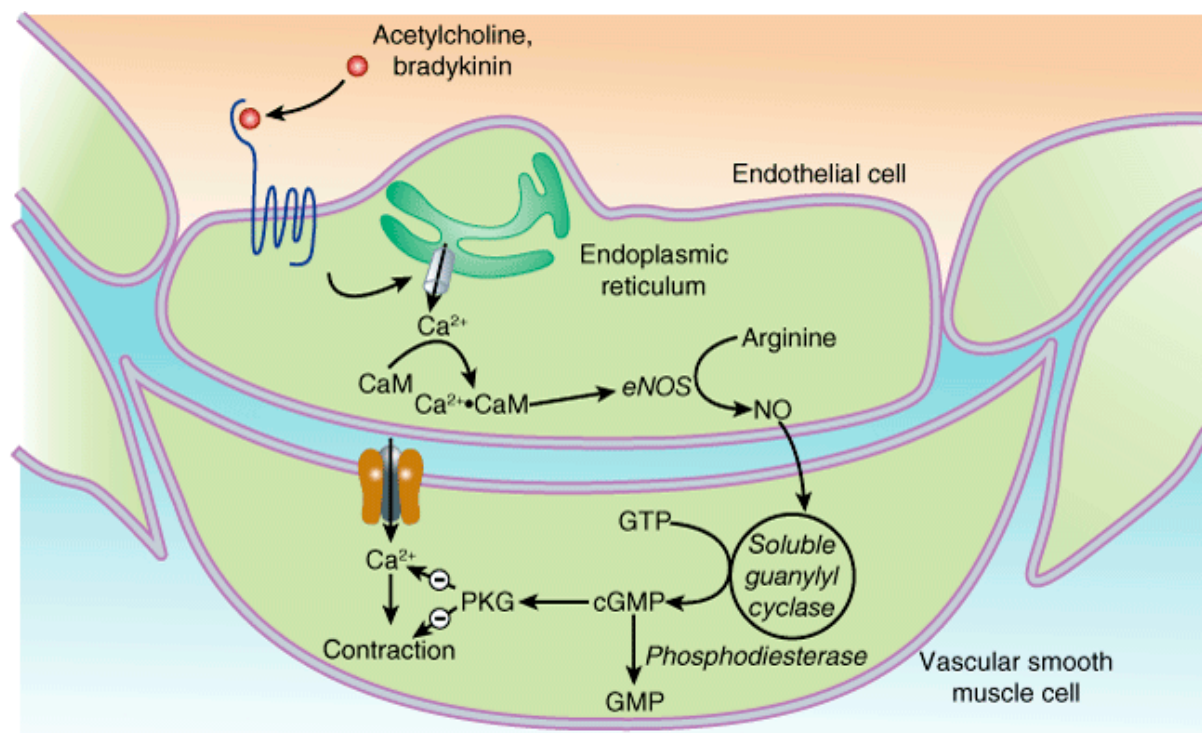
Bien que le peroxy-nitrite était connu des chimistes, Beckman *et al.* proposèrent pour la 1<sup>re</sup> fois en 1990 que cette molécule pouvait être formée *in vivo* par la combinaison de l'oxyde nitrique (NO<sup>•</sup>) et de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Beckman, Beckman *et al.* 1990). La demi-vie du peroxy-nitrite est d'environ 1 s, permettant à cette molécule très réactionnelle d'agir sur diverses biomolécules (voir point 3) (Ronson, Nakamura *et al.* 1999). Cette réaction peut survenir dans la paroi des vaisseaux sanguins où il y a formation d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et de NO<sup>•</sup>.

A pH physiologique il existe une production faible et constante de radicaux libres au sein de la cellule endothéliale. Ces radicaux libres assurent des rôles variés et essentiels à la cellule en agissant comme messagers secondaires, en modulant les fonctions cellulaires (modulation de l'expression de gènes antioxydants, de l'apoptose/nécrose, de la réponse immune, ...) (Valko, Leibfritz *et al.* 2007; Buonocore, Perrone *et al.* 2010). Toutefois, la concentration en radicaux libres doit être régulée; leur surproduction est responsable de l'induction de réponses de stress. Il en résulte des stress dits oxydatif ou nitrosatif, lesquels sont dus à un excès d'espèces réactives oxygénées (*reactive oxygen species* ou ROS) ou azotées (*reactive nitrogen species* ou RNS).

Parmi ces espèces radicalaires, figurent notamment le NO<sup>•</sup> et l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. A de fortes concentrations, le NO<sup>•</sup> entre en compétition avec les « superoxide dismutases » (SOD) et réagit avec les anions O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, formant du peroxy-nitrite. De part leur nature radicalaire, le NO<sup>•</sup> et l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> réagissent rapidement entre eux.

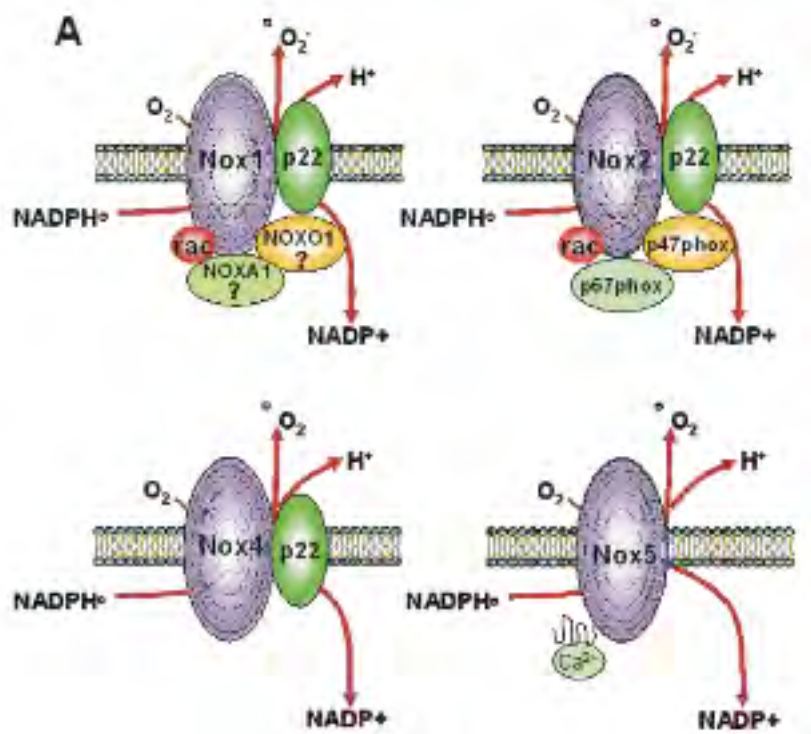


**Figure I.3. – Synthèse de NO<sup>•</sup> par la eNOS** (Förstermann and Munzel 2006)



**Figure I.4. – Production et effets du NO<sup>•</sup> sur la vasorelaxation** (Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ : Basic & Clinical Pharmacology, 11<sup>th</sup> edition. (<http://www.accessmedicine.com>))





**Figure I.5. – Structure et mode d'action de l'enzyme NADP(H) oxydase dans la production d'anions superoxyde (Dworakowski, Anilkumar et al. 2006)**



### 1.2. L'oxyde nitrique et les NO synthases

Le NO $\cdot$  est une molécule produite par 3 isoformes de « nitric oxide synthase » (NOS) : la NOS neuronale (nNOS), la NOS inducible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS) (Mungrue, Bredt et al. 2003). D'un point de vue structural, les NOS sont des enzymes homodimériques, constituées de 2 domaines distincts : le domaine réductase (C-terminal) et le domaine oxygénase (N-terminal) (Förstermann 2010) (**Figure I.3**). En conditions physiologiques, le NO $\cdot$  est produit en faibles quantités par la eNOS. Quant à la iNOS, elle est induite en conditions inflammatoires, suite à l'activation des macrophages et peut dès lors augmenter fortement la production de NO $\cdot$ .

Tout comme pour la NAD(P)H oxydase, il existe un transfert d'électrons au niveau du domaine réductase de la eNOS. Ce transfert d'électrons se fait via l'oxydation du NADPH en NADP $^+$  + H $^+$ . Ces électrons sont ensuite transférés à la FAD, à la FMN et parviennent finalement au groupement prosthétique hème, situé au niveau du domaine oxygénase de la NOS, ce qui permet la réduction et l'activation de l'O $_2$ . Au final, la présence d'O $_2$  activé et de la L-arginine engendre la formation de NO $\cdot$  et d'un sous-produit nommé L-citrulline. La eNOS est activée par le calcium. En effet, au plus la concentration en calcium intracellulaire est élevée, au plus elle favorise la liaison de la calmoduline à la eNOS, ce qui se traduit par un transfert d'électrons au groupement hème plus important. Quant à l'activation calcium-indépendante de la NOS, médiée par le *shear stress*, elle favorise la production de NO $\cdot$  par phosphorylation de l'enzyme (Fisslthaler, Dimmeler et al. 2000). Dans des conditions non pathologiques et grâce à ses propriétés vasodilatatrices puissantes, le NO $\cdot$  permet l'activation de la guanylate cyclase, laquelle produit la GMPc au niveau des cellules musculaires lisses (CML) de la paroi vasculaire. La GMPc active alors une cascade de kinases, dont la protéine kinase C (PKC) agissant notamment sur le cytosquelette contractile, ce qui mène finalement à la vasorelaxation (Mayer, Schrammel et al. 1995) (**Figure I.4**).

### 1.3. L'anion superoxyde

L'O $_2^{\cdot-}$  est quant à lui *dismuté* par les SOD en H $_2$ O $_2$ . Il existe différentes sources de production des anions O $_2^{\cdot-}$  : la NAD(P)H oxydase et la xanthine oxydase endothéliales, la chaîne respiratoire mitochondriale ou encore, l'activation des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), entre autres lors de l'ischémie-reperfusion (voir point 2.1.2.) (Ronson, Nakamura et al. 1999). La NADPH oxydase est un complexe enzymatique retrouvé au niveau des fibroblastes, des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales. Sa surexpression peut mener au découplage des eNOS, accentuant d'autant plus le stress oxydatif (Landmesser, Dikalov et al. 2003; Förstermann 2010). Par ailleurs, suivant le type cellulaire (PMN, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales), la structure du complexe NAD(P)H oxydase diffère (**Figure I.5**).

Certains processus inflammatoires favorisent l'activation des NAD(P)H oxydases et des xanthine oxydases, ce qui entraîne une surproduction d'O $_2^{\cdot-}$ . Si les anions O $_2^{\cdot-}$  sont produits en grandes quantités en même temps que du NO $\cdot$ , ils réagissent préférentiellement avec ce dernier (Pacher, Beckman et al. 2007). En effet, le taux de réaction entre l'O $_2^{\cdot-}$  et la SOD est 3,5 fois plus faible comparé au taux de réaction entre le NO $\cdot$  et l'O $_2^{\cdot-}$  (permettant la formation de peroxynitrite) et vaut approximativement  $6,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Burney, Niles et al. 1999).

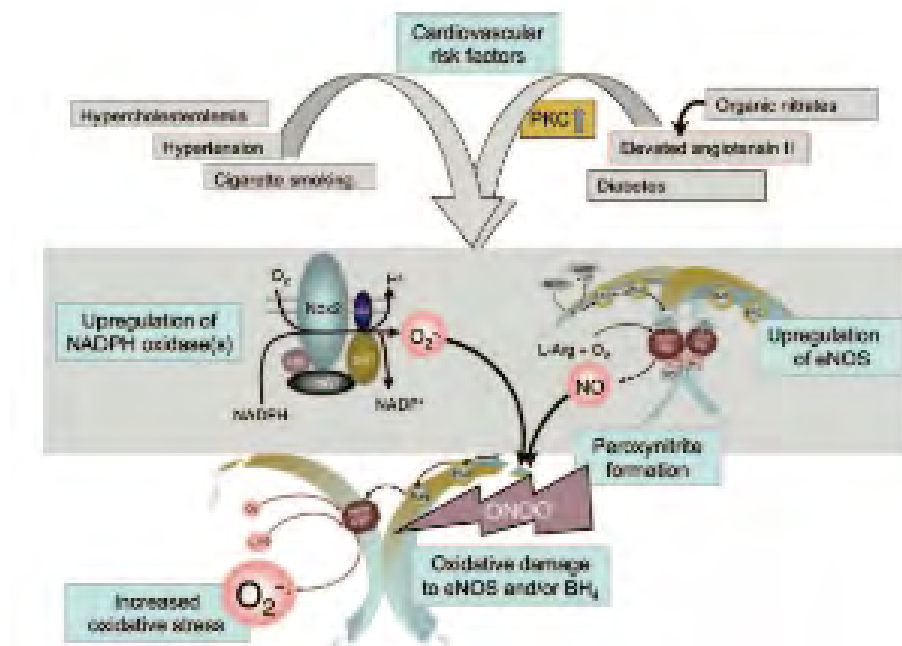


Figure I.6. – Schéma illustrant la formation de peroxynitrite à partir de NO<sup>•</sup> et d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Förstermann and Munzel 2006)

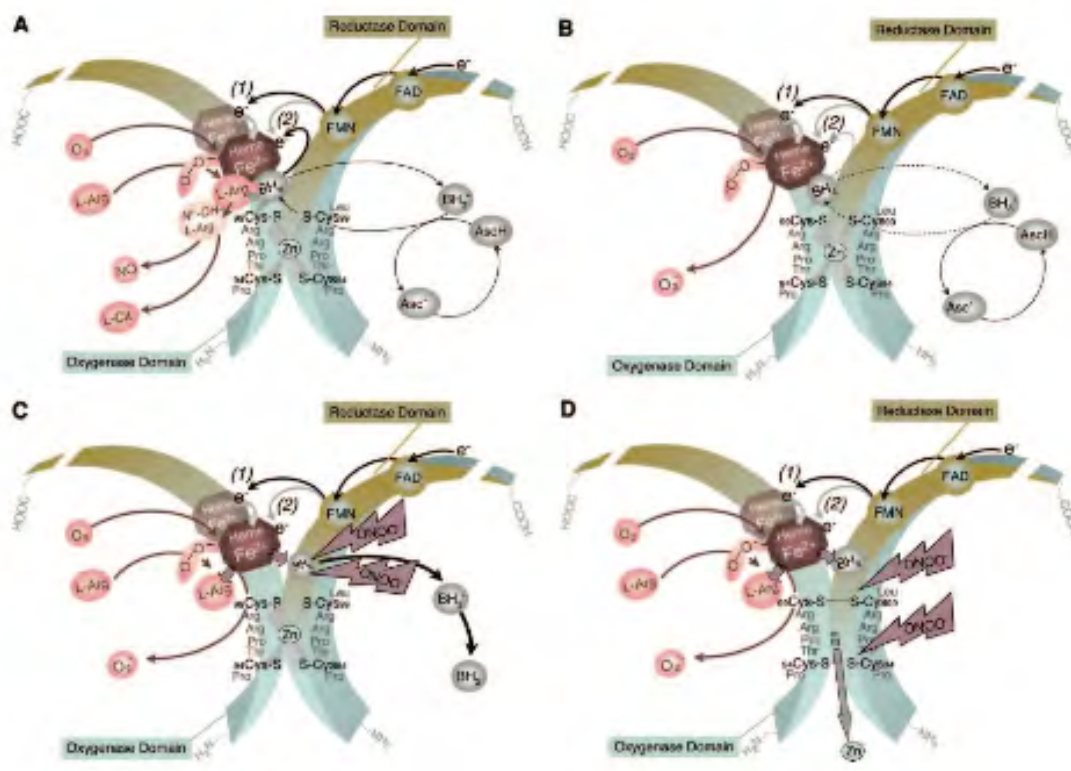


Figure I.7. – Schéma illustrant le découplage de la eNOS via le peroxynitrite (Förstermann and Munzel 2006)

## Renin-angiotensin-aldosterone system

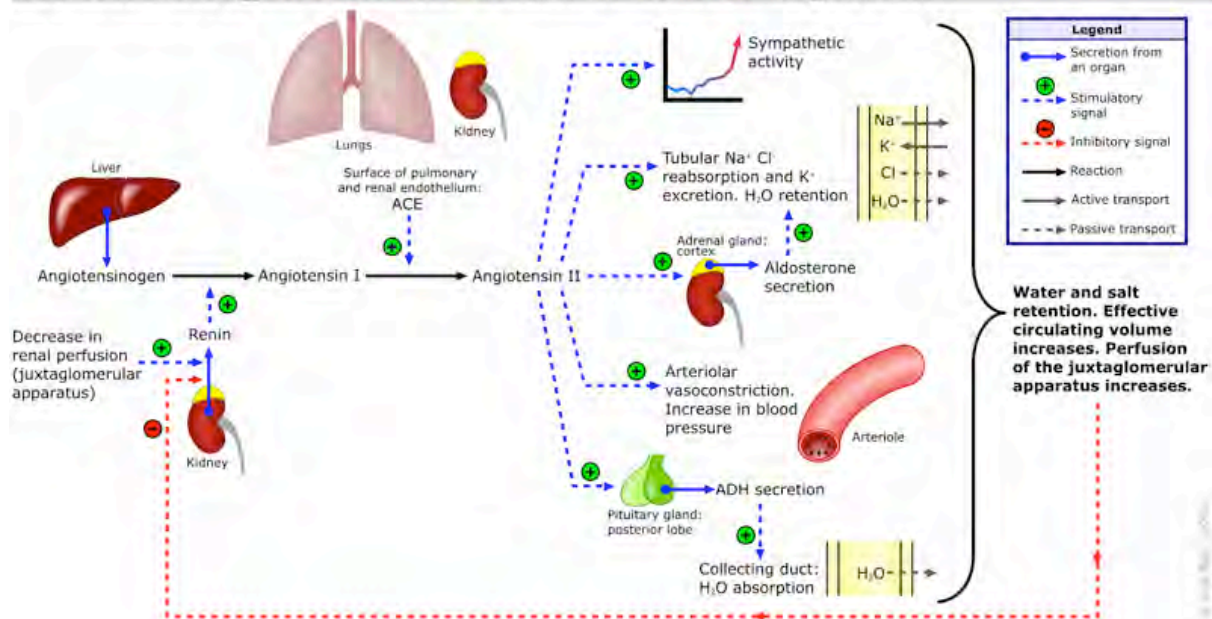


Figure I.8. – Le système rénine-angiotensine et rôles de l'Angiotensine-II ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Renin-angiotensin-aldosterone\\_system.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Renin-angiotensin-aldosterone_system.png))

### 1.4. Lien entre peroxynitrite et dysfonctionnement endothélial

Dans certaines conditions pathologiques, il y a production concomitante de fortes concentrations en  $\text{NO}^\cdot$  et  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , dont la combinaison forme du peroxynitrite (**Figure I.6**). D'un point de vue mécanistique, le peroxynitrite va tout d'abord conduire à l'inactivation de la SOD, l'enzyme détoxifiant les anions  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Ensuite, le peroxynitrite engendre le découplage de la eNOS en provoquant l'oxydation et l'inactivation de la tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ). La eNOS découplée se convertit en une enzyme produisant des anions  $\text{O}_2^{\cdot-}$  au lieu du  $\text{NO}^\cdot$ . En outre, ce découplage de la eNOS est aggravé par la production de mélanges complexes ROS/RNS qui affectent également un *cluster* de cystéines critiques pour la dimérisation. L'enzyme devient monomérique, incapable de produire le  $\text{NO}^\cdot$ , ce qui réduit d'autant plus la biodisponibilité en  $\text{NO}^\cdot$  (**Figure I.7**). Finalement, toutes ces modifications induites par de fortes concentrations en peroxynitrite vont mener à un dysfonctionnement endothélial, à la base des maladies cardiovasculaires et plus particulièrement, à l'athérosclérose.

### 1.5. Facteurs de risques cardiovasculaires favorisant le dysfonctionnement endothélial

Dans la littérature, différents facteurs de risques cardiovasculaires sont connus pour induire un dysfonctionnement endothélial. Parmi ces facteurs de risques cardiovasculaires figurent notamment le diabète sucré, l'hypertension, l'hypercholestérolémie et le tabagisme. Ces derniers sont brièvement décrits ci-dessous.

#### 1.5.1. Le diabète sucré

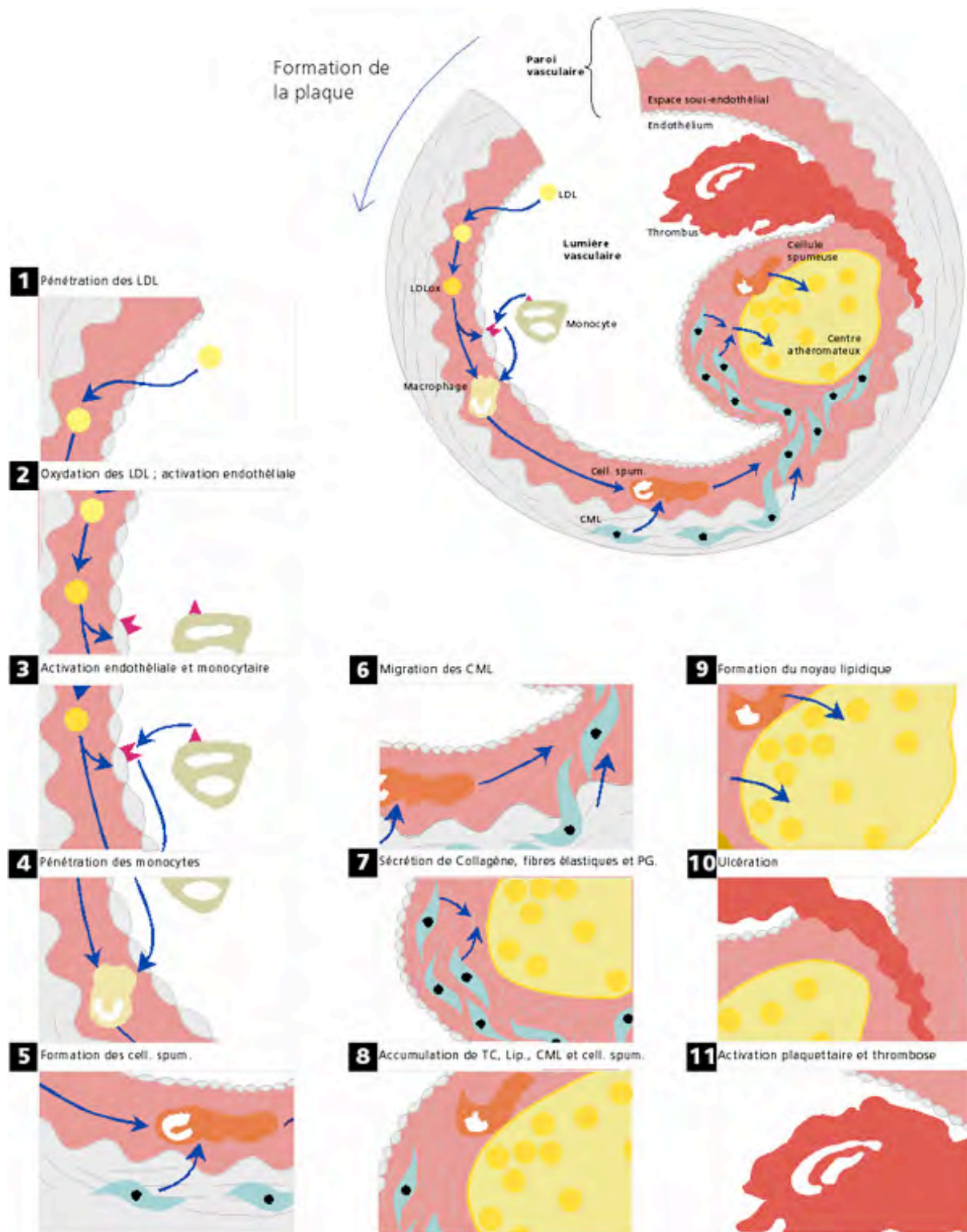
Les patients souffrant de diabète sucré présentent des taux de glucose dans le sang dépassant les valeurs normales; on parle d'hyperglycémie. Cette hyperglycémie est responsable d'une élévation de la concentration en diacylglycérol (DAG), activant les protéines kinases C (PKC). L'activation des PKC va conduire à la formation de peroxynitrite, de part une surproduction en  $\text{NO}^\cdot$ , induite par la phosphorylation de la iNOS et une surproduction en  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Calles-Escandon and Cipolla 2001; Hink, Li et al. 2001).

#### 1.5.2. L'hypertension

L'hypertension est liée à une vasoconstriction trop intense, due entre autres à « l'activation du système rénine-angiotensine » (Touyz and Schiffrin 2004) (**Figure I.8**). Il en résulte un stress oxydatif lié à une surproduction de ROS, en particulier d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Dans le cas de l'hypertension, ces  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sont issus de la surexpression de la NADP(H) oxydase ou d'un découplage de la eNOS, notamment au niveau de l'aorte et des vaisseaux du rein. Par ailleurs, différents mécanismes antioxydants sont généralement mis en place pour réguler la production de radicaux libres. Par exemple, la vitamine E constitue un *scavenger* de ROS bien connu. Chez des patients souffrant d'hypertension, les défenses antioxydantes ne semblent pas assez efficaces face à une production de ROS trop élevée.

#### 1.5.3. L'hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie est caractérisée par un taux de cholestérol trop élevé dans le sang. L'« American Heart Association » recommande des taux de cholestérol total inférieurs à 200 mg/dL ; elle considère qu'il y a hypercholestérolémie à partir de taux compris entre 200 et 239 mg/dL et très forte hypercholestérolémie quand ces taux dépassent 240 mg/dL (Stapleton, Goodwill et al. 2010). Il a été montré que l'hypercholestérolémie s'accompagne



**Figure I.9. – Les différentes étapes de l'athérosclérose : Illustration du développement de plaques athérosclérotiques** ([http://jleoni.free.fr/contenu/illustrations/preview/2-1\\_small.jpg](http://jleoni.free.fr/contenu/illustrations/preview/2-1_small.jpg))

d'une élévation en diméthylarginine asymétrique (ADMA). Cette ADMA est un compétiteur endogène de la L-arginine, un des substrats requis pour la synthèse de NO $\cdot$  par les NOS (Cannon 1998; Vladimirova-Kitova 2008). Il en résulte une diminution de la concentration en NO $\cdot$ , favorisant ainsi des conditions pro-inflammatoires et pro-oxydantes, ce qui mène par conséquent, à un dysfonctionnement endothélial (Hayakawa and Raj 1999).

### 1.5.4. Le tabagisme

Dans le contexte des maladies cardiovasculaires, le tabac favorise l'apparition de conditions pro-oxydantes, en libérant notamment des cytokines pro-inflammatoires

Il en résulte la perturbation des équilibres entre molécules anti-/pro-oxydantes, caractéristique d'un dysfonctionnement endothélial (Bullen 2008). Des chercheurs ont d'ailleurs démontré l'impact de cette perturbation sur la génération de NO $\cdot$ . Pour ce faire, ils ont étudié la production de NO $\cdot$  dans des HUVECs incubés en présence de sérum de fumeurs ou de non fumeurs. L'incubation d'HUVECs en présence de sérum de fumeurs résultait en la chute de génération en NO $\cdot$  (Barua, Ambrose et al. 2001). Finalement, les fumeurs peuvent présenter des concentrations en LDLs oxydées particulièrement élevées, ce qui traduit cet état de stress oxydatif exacerbé et contribue aussi au développement de plaques athérosclérotiques.

### 1.6. Lien entre dysfonctionnement endothélial et athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires constituent une des 1<sup>ères</sup> causes de décès dans le monde. L'athérosclérose est une maladie cardiovasculaire se caractérisant par la formation de plaques athéromateuses dont l'accumulation entraîne un remodelage de la paroi vasculaire, aboutissant à un rétrécissement des artères de moyen et de gros calibres (**Figure I.9**). L'athérosclérose est liée à l'hypercholestérolémie, mais est aussi favorisée par un dysfonctionnement endothélial. Elle implique notamment les cellules endothéliales et les macrophages. En conditions inflammatoires, ces macrophages se gorgent de LDLs oxydées, deviennent des cellules spumeuses et leur accumulation donne finalement lieu à la formation des plaques athéromateuses. Les facteurs de risque évoqués pour le dysfonctionnement endothélial sont donc aussi des facteurs de risque décrits pour l'athérosclérose.

## 2. La formation de peroxynitrite

Etant donné l'importance du peroxynitrite dans le dysfonctionnement endothélial, nous allons passer en revue des conditions décrites dans la littérature pour favoriser sa formation *in situ*, dans les cellules et les tissus, mais aussi des modèles expérimentaux de formation de peroxynitrite *in vitro*, en culture de cellules.

### 2.1. Production de peroxynitrite *in situ*

En conditions physiologiques, le NO $\cdot$  et les anions O $_2^{\cdot-}$  ne sont produits qu'en faibles quantités et sont donc peu cytotoxiques. Par contre en conditions inflammatoires, associées à divers facteurs de risque cardiovasculaire, il y a une augmentation locale, importante, des concentrations en O $_2^{\cdot-}$  et en NO $\cdot$ . Cela crée un microenvironnement dans lequel aura lieu la formation spontanée de peroxynitrite (Ronson, Nakamura et al. 1999). Parmi les facteurs de risques cardiovasculaires connus pour entraver le bon fonctionnement du système cardiovasculaire figurent le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le tabagisme, ...



mais également des taux importants en homocystéine (Forstermann and Munzel 2006), en angiotensine-II, ou l'oxydation des LDLs (low density lipoproteins).

Que ce soit *in vivo* ou en culture, plusieurs conditions ont été décrites pour favoriser la formation de peroxy-nitrite dans des cellules endothéliales, dont l'hyperhomocystéinémie (Zhang, Li et al. 2000), l'ischémie-reperfusion (Zhou, Jin et al. 2003) ou l'exposition à des LDLs oxydées (Zmijewski, Landar et al. 2005). De plus, l'angiotensine-II stimule la NAD(P)H oxydase, augmentant la quantité d'anions  $O_2^{\cdot -}$  produits. Ces anions sont alors susceptibles de réagir avec le  $NO^{\cdot}$  pour former du peroxy-nitrite (Ko, Lee et al. 2007).

### 2.1.1. Hyperhomocystéinémie

L'homocystéine (HCy) est un acide aminé du plasma. Sa concentration est de l'ordre de 5-10  $\mu M$  chez des sujets sains, dépendant de la fonction rénale et du statut en folate (Cheng, Yang et al. 2009). L'HCy est connue pour induire l'expression de la hème oxygénase-1 (*hmx-1*) (Liu, Peyton et al. 2005). *Hmx-1* constitue un des gènes cibles de la voie Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), un facteur de transcription principalement impliqué dans les réponses antioxydantes et qui sera vu au point 3.2.1. Dans la littérature, l'HCy est aussi connue pour augmenter l'expression, tant au niveau ARNm que protéique, de Grp78/BiP, une chaperone du réticulum endoplasmique (RE) jouant un rôle clef dans la réponse UPR (ou « *unfolded protein response* ») (voir point 3.2.2.) (Zhang, Cai et al. 2001). On parle d'hyperhomocystéinémie modérée pour des concentrations plasmatiques entre 16 et 30  $\mu M$  et d'hyperhomocystéinémie sévère pour des concentrations supérieures à 200  $\mu M$ . Celle-ci a été décrite notamment pour induire la formation de peroxy-nitrite dans des artères coronariennes de rats (Ungvari, Csiszar et al. 2002). Cette condition pathologique peut induire un dysfonctionnement endothélial en inhibant la production de  $NO^{\cdot}$  et/ou en activant le récepteur AT-1 à l'angiotensine-II (voir point 2.1.4.). L'hyperhomocystéinémie peut aussi mener à un stress oxydatif en diminuant les défenses antioxydantes de la cellule (Lentz and Haynes 2004).

### 2.1.2. Ischémie-Reperfusion

L'ischémie-reperfusion (I/R) *in vivo*, mimée par l'hypoxie-réoxygénation (H/R) *in vitro*, a été décrite dans la littérature comme induisant la génération de ROS au sein de la cellule, dont le peroxy-nitrite (Zou and Bachschmid 1999). L'ischémie cardiaque est un phénomène caractérisé par un apport sanguin au cœur insuffisant, par exemple suite à un infarctus du myocarde (Becker 2004). Pour limiter les dégâts, on doit reperfusionner le cœur, mais cette reperfusion a elle-même des effets délétères. En effet, paradoxalement durant l'ischémie, il y a déjà production de ROS, malgré la diminution en  $O_2$ , au niveau de la chaîne de transport d'électrons (Becker 2004). Au cours de la reperfusion, la réintroduction d' $O_2$  entraîne un *burst* de ROS dont l' $O_2^{\cdot -}$  et le  $NO^{\cdot}$ , bien décrits dans la littérature. L'I/R favorise en outre l'interaction entre les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) activés par l'I/R et les cellules endothéliales (Xia and Zweier 1997). Les PMN activés par l'I/R génèrent des ROS, dont le peroxy-nitrite (Carreras, Pargament et al. 1994; Rohn, Nelson et al. 1999). Les cellules endothéliales constituent le 1<sup>er</sup> type cellulaire souffrant de cette production de ROS (Ng, Deshpande et al. 2002). Cependant, les cardiomyocytes sont également exposés. Lorsque l'I/R est exacerbée dans le cœur, la concentration en  $O_2^{\cdot -}$  augmente fortement. La iNOS est également induite, générant du  $NO^{\cdot}$ . Cette formation de ROS et de RNS peut induire la mort des cardiomyocytes (Wang, Zhang et al. 2006).

### 2.1.3. Les LDL oxydées

Suite à des études antérieures dans notre laboratoire, portant sur les effets de LDLs (low density lipoproteins) oxydées dans des cellules endothéliales et des macrophages en culture, nous nous sommes demandés si elles pouvaient induire la formation de peroxy-nitrite dans les cellules endothéliales (Zmijewski, Landar et al. 2005). Les LDLs sont des lipoprotéines complexes du plasma, impliquées dans le transport du cholestérol et de triglycérides. En conditions inflammatoires, les LDLs s'accumulent à l'intérieur des vaisseaux sanguins, induisant la formation de plaques athéromateuses, lesquelles favorisent le développement des maladies cardiovasculaires (**Figure I.9**). A mesure que ces LDLs s'accumulent dans la paroi vasculaire, elles s'oxydent et par conséquent, induisent une réaction inflammatoire en activant les macrophages, les lymphocytes T ainsi que les cellules endothéliales. Ces LDLs oxydées s'accumulent également dans les macrophages, lesquels deviennent des cellules spumeuses qui forment les lésions athérosclérotiques (Pappalardo, Musumeci et al. 2008).

*In vitro*, les LDLs peuvent être oxydées en présence de cuivre (OxLDLs) ou de la myéloperoxydase (MoxLDLs). Bien que les mécanismes d'oxydation des LDLs *in vivo* demeurent encore méconnus à ce jour, les MoxLDLs sont probablement plus pertinentes d'un point de vue physiologique. En effet, la plupart des études travaillant avec des OxLDLs *in vitro* recourent bien souvent à des concentrations en  $\text{CuSO}_4$  de 10-20  $\mu\text{M}$ , dépassant largement les concentrations physiologiques comme souligné par (Calay, Rousseau et al. 2010).

Les LDL oxydées au cuivre comme celles oxydées avec la myéloperoxydase sont capables de déclencher un stress oxydatif, comme cela été démontré entre autres sur des macrophages murins RAW 264.7 (Calay, Rousseau et al. 2010). Une des voies par laquelle les LDLs oxydées mènent à un stress oxydatif, passe par l'activation de la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2). L'activation de la PLA2 induit le clivage de phospholipides. Ce clivage libère l'arachidonate, lequel va finalement activer la NAD(P)H oxydase et générer la production de ROS (Kim, Kim et al. 2008). Cette voie de production de ROS, a été démontrée pour les MoxLDLs, mais pas pour les OxLDLs, en macrophages murins (Calay, Rousseau et al. 2010). Par ailleurs, ce stress oxydatif médié par les OxLDLs a également été mis en évidence dans des cellules endothéliales (Galle, Hansen-Hagge et al. 2006). Ce stress génère notamment une surproduction en  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , de part une activation de la NAD(P)H oxydase, mais aussi via le découplage de la eNOS, à la base du dysfonctionnement endothélial. Zmijewski *et al.* (2005) stimulant des cellules endothéliales bovines avec des OxLDLs démontrent la formation de ROS, au niveau de la mitochondrie. Cette production est réduite en présence d'urate et ces auteurs suggèrent que la production de ROS qu'ils observent, serait donc liée à la formation de peroxy-nitrite (Zmijewski, Moellering et al. 2005).

### 2.1.4. L'angiotensine-II

L'angiotensine-II (Ang-II) est un peptide vasoconstricteur, appartenant au système rénine-angiotensine (**Figure I.8**). Tout d'abord, la rénine convertit l'angiotensinogène inactif en angiotensine-I peu active. Ensuite, l'angiotensine-I est convertie en angiotensine-II active, via l'enzyme ACE (angiotensin converting enzyme). Le système rénine-angiotensine est activé par la diminution de la pression sanguine et favorise la vasoconstriction.



## INTRODUCTION

---

En conditions physiologiques, l'Ang-II est un agent vasoconstricteur augmentant la pression artérielle et régulant divers processus de « croissance cellulaire, apoptose, migration et inflammation » (Touyz and Schiffrin 2004).

En conditions de stress, l'enzyme ACE et le récepteur AT1 (Förstermann 2010) sont surexprimés, ce qui se traduit par une élévation de la concentration en Ang-II, une augmentation de la liaison de l'Ang-II à son récepteur et une activation de la NAD(P)H oxydase. Cette cascade d'événements est responsable d'une augmentation de la concentration en anions  $O_2^{\cdot -}$  (Rajagopalan, Kurz et al. 1996). Cette surproduction en  $O_2^{\cdot -}$  due à l'Ang-II active à son tour l'ACE (Warnholtz, Nickenig et al. 1999) et se déroule en 2 temps. La 1<sup>ère</sup> phase est caractérisée par une production rapide de ROS, dont les anions  $O_2^{\cdot -}$  (30 s) qui dépend de l'activation de PKC. Quant à la 2<sup>ème</sup> phase, elle est plus lente (30 min-6 h) et par conséquent, plus favorable à l'activation de voies de signalisation « à long terme » (Seshiah, Weber et al. 2002).

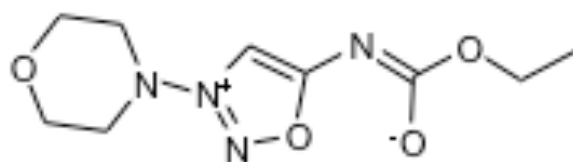
Il a aussi été montré chez des souris que l'Ang-II favorise le dysfonctionnement endothélial, de part l'augmentation des taux en ROS et l'inhibition de la voie de signalisation du  $NO^{\cdot}$  (Ide, Hirase et al. 2008). De plus, des cellules endothéliales bovines en culture stimulées avec l'Ang-II, voient leur production de  $NO^{\cdot}$  diminuer de moitié (Doughan, Harrison et al. 2008). Celle-ci est restaurée par l'ajout d'acide urique dans le milieu. Nous reviendrons sur l'acide urique au point 4.3. Warnholtz et son équipe ont établi une corrélation entre le système rénine-angiotensine et le développement de lésions athérosclérotiques, lesquelles présentent une forte concentration en ACE (Warnholtz, Nickenig et al. 1999). Ces lésions athérosclérotiques semblent régresser en présence d'inhibiteurs d'ACE (ex : Quinapril), ce qui permet de contrecarrer le dysfonctionnement endothélial. Certains chercheurs ont montré dans des aortes de lapin souffrant d'hypercholestérolémie que le récepteur AT1 est également induit par les LDLs *in vitro* (Warnholtz, Nickenig et al. 1999). Il en résulte une surproduction en anions  $O_2^{\cdot -}$ .

Par ailleurs, les interactions entre l'Ang-II et le  $NO^{\cdot}$  restent controversées. Ainsi, l'Ang-II pourrait aussi stimuler la production de  $NO^{\cdot}$  (Pueyo, Arnal et al. 1998). Il existe d'ailleurs plusieurs mécanismes de génération de  $NO^{\cdot}$  stimulés par l'Ang-II, dépendant du type cellulaire considéré. Au niveau des cellules endothéliales, la stimulation de la production de l'inositol triphosphate (IP3) par l'Ang-II induit une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Il en résulte une activation de la eNOS et donc, une production de  $NO^{\cdot}$ . La présence simultanée de  $NO^{\cdot}$  et d' $O_2^{\cdot -}$  va finalement permettre la formation de peroxynitrite.

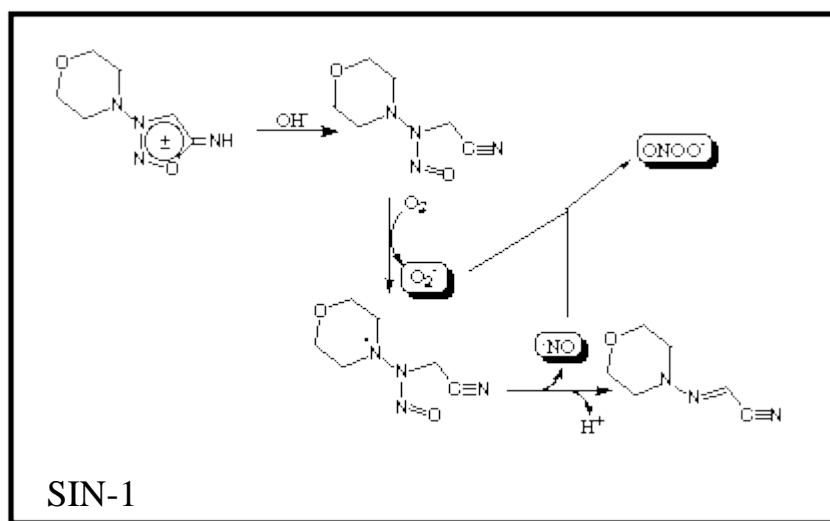
Plusieurs études suggèrent donc que l'HCy, les LDLs oxydées, l'Ang-II ainsi que l'I/R peuvent favoriser la production de peroxynitrite. Par ailleurs, les effets du peroxynitrite sur les cellules peuvent être étudiés *in vitro*, en ayant recours à des systèmes de formation de peroxynitrite en culture.

### 2.2. Systèmes expérimentaux de génération de peroxynitrite *in vitro*

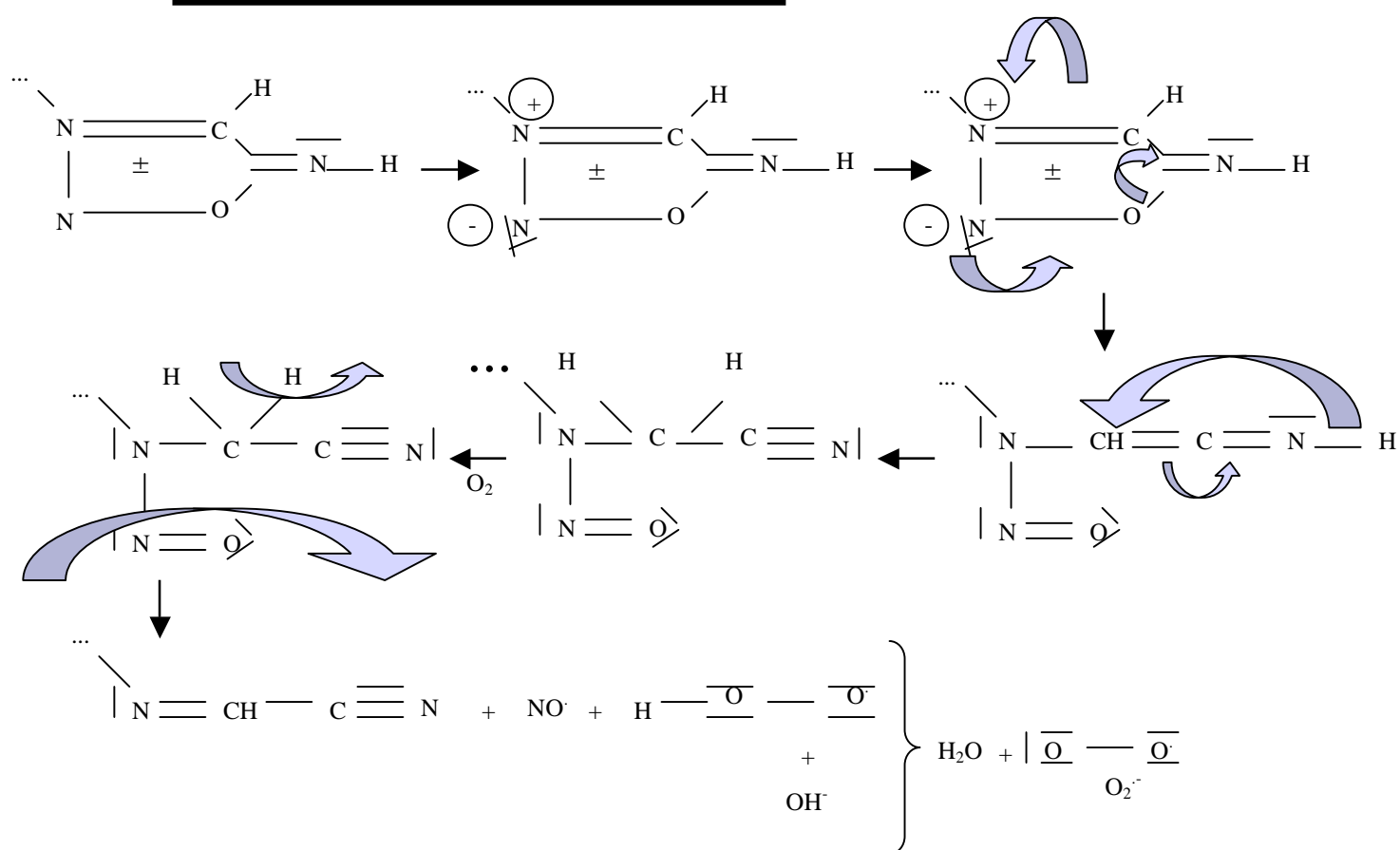
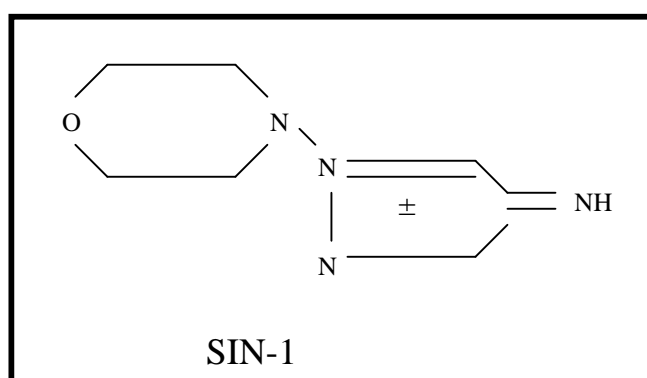
Depuis 1990, diverses études *in vitro* se sont intéressées à la molécule de peroxynitrite et à ses effets sur des cellules en culture. Pour ce faire, on utilise soit du peroxynitrite synthétique, soit des molécules synthétiques menant à la formation de peroxynitrite.



**Figure I.10. – Structure de la molsidomine, molécule précurseur du SIN-1**  
<http://www.pharmawiki.ch>



**Figure I.11. – Structure du SIN-1, un donneur de peroxynitrite**  
[http://www.dojindo.com/home/index.php?option=com\\_content&view=article&id=85:nl001-1&catid=42:nl001&Itemid=60](http://www.dojindo.com/home/index.php?option=com_content&view=article&id=85:nl001-1&catid=42:nl001&Itemid=60)



**Figure I.12. – Schéma explicatif détaillant les réactions moléculaires permettant de produire du peroxynitrite à partir du SIN-1**

### 2.2.1. Peroxynitrite synthétique

En 1997, Yasmin et ses collègues ont voulu démontrer l'implication du peroxynitrite dans le phénomène d'I/R, au niveau de canaux aortiques de rats (Yasmin, Strynadka et al. 1997). La procédure expérimentale est basée sur le travail de Villa et de son équipe (Villa, Salas et al. 1994). Elle consiste à synthétiser du peroxynitrite, à partir d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et de  $\text{NaNO}_2$ , au sein d'un dispositif expérimental particulier. L'ajout ultérieur de  $\text{NaOH}$ , directement après la formation de peroxynitrite, permet de le stabiliser. Si le  $\text{NaOH}$  est ajouté 3 minutes après réaction, le peroxynitrite a eu le temps de se décomposer, ce qui permet l'utilisation de dérivés de peroxynitrite, bien plus stables que la molécule de peroxynitrite en tant que telle. Enfin, le peroxynitrite ou ses dérivés sont dilués dans de l'eau milliQ et manipulés sur glace, juste avant utilisation car sous forme diluée, le peroxynitrite ne peut être conservé plus de 2 h.

Etant donné le caractère instable du peroxynitrite, rendant son étude peu aisée, d'autres systèmes de formation de cette molécule *in vitro* ont été mis en place. Le plus fréquemment, les chercheurs ont recours à des donneurs artificiels de peroxynitrite, tels que l'hydrochlorure de 3-morpholinosydnonimine (SIN-1).

### 2.2.2. Hydrochlorure de 3-morpholinosydnonimine (SIN-1)

Le SIN-1 est le métabolite actif formé à partir d'un vasodilatateur synthétique utilisé pour soigner certains troubles cardiaques, la molsidomine (ou Corvaton), grâce à des estérases du foie (Singh, Hogg et al. 1999) (**Figure I.10**). Le SIN-1 est considéré comme un mimétique de peroxynitrite, car sa décomposition permet la formation de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et  $\text{NO}^{\cdot}$  (**Figure I.11**). Cette décomposition se déroule en 3 étapes, générant successivement le SIN-1A,  $\text{SIN-1}^{\cdot+}$  et SIN-1C. Tout d'abord, le SIN-1 subit une 1<sup>ère</sup> réaction de décomposition en SIN-1A. Cette réaction nécessite la présence d'une base, ce qui provoque l'ouverture de son cycle sydnonimine. Ensuite, le transfert d'un seul électron permet au SIN-1A de réduire l' $\text{O}_2$  en  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et de générer le sous-produit  $\text{SIN-1}^{\cdot+}$  dont la décomposition spontanée donne du SIN-1C et du  $\text{NO}^{\cdot}$ . La libération simultanée d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  et de  $\text{NO}^{\cdot}$  permet finalement la formation de peroxynitrite (**Figure I.12**). De nombreux chercheurs travaillant sur des cellules endothéliales ont eu recours au SIN-1 en tant que donneur de peroxynitrite (Mathy-Hartert, Mouithys-Mickalad et al. 2000; Eligini, Habib et al. 2001; Martin-Romero, Gutierrez-Martin et al. 2004; Navarro-Antolin, Redondo-Horcajo et al. 2007; Tanaka, Qiang et al. 2009).

Après avoir vu l'importance du peroxynitrite dans le contexte du dysfonctionnement endothelial et dans quelles conditions il peut être produit, nous allons aborder les effets que peut exercer cette molécule hautement réactionnelle.

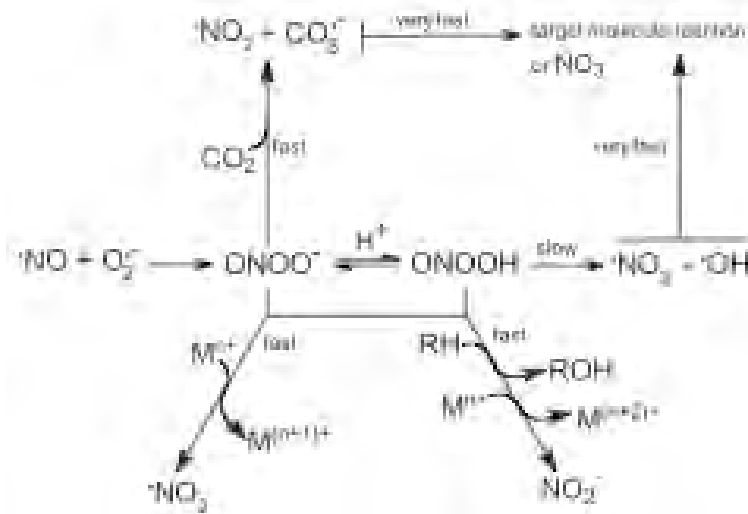
## 3. Effets du peroxynitrite

Selon les quantités de peroxynitrite en présence et selon les temps d'exposition, il peut être toxique (voir point 3.1) ou agir en tant que messager secondaire (voir point 3.2).

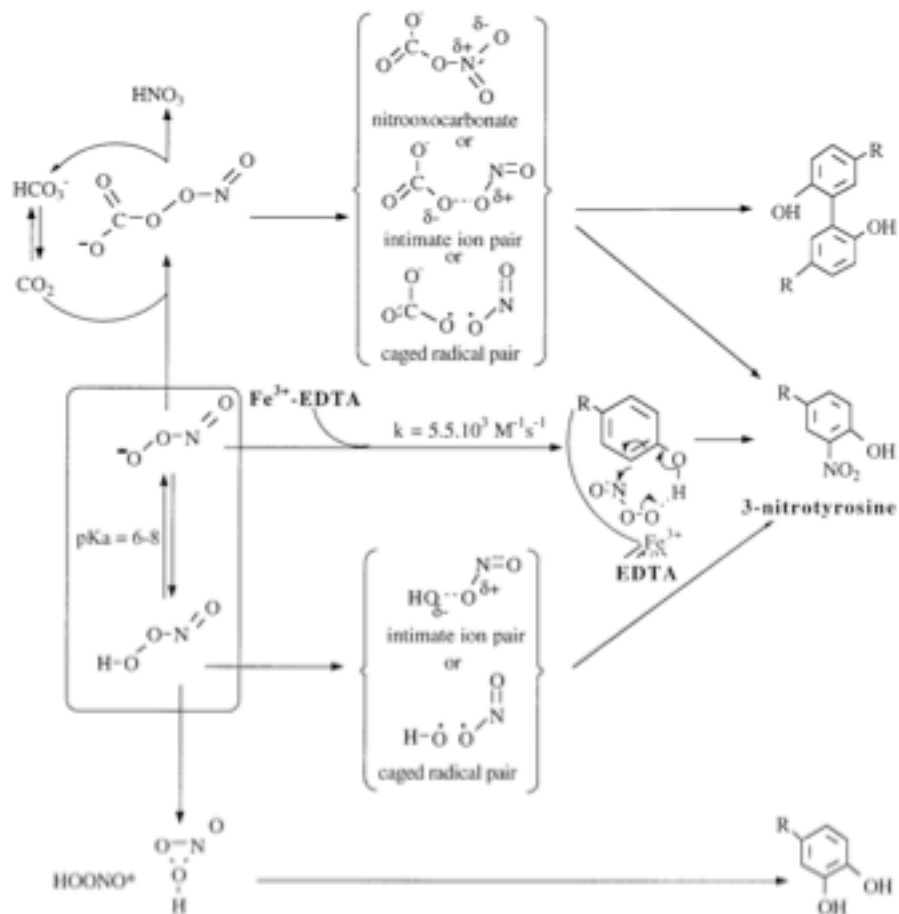
### 3. 1. Effets directs – Le peroxynitrite en tant que molécule toxique

Le peroxynitrite est une molécule très réactionnelle qui, en conditions stressantes, interagit avec les acides nucléiques, les lipides et les protéines. A titre d'exemple, il participe

A



B



**Figure I.13. – Processus de nitration sur résidus tyrosines, induit par le peroxynitrite.**  
 (A) Différentes réactions impliquant le peroxynitrite (Alvarez and Radi 2003). (B) Mécanismes de nitration médiée par le peroxynitrite (Ducrocq, Blanchard et al. 1999).

à la peroxydation des lipides ainsi qu'à l'oxydation des groupements thiols et à la nitration de résidus tyrosines.

### *3.1.1. Effets sur les acides nucléiques*

Le peroxynitrite peut générer des cassures simple brin de l'ADN par oxydation des bases nucléiques, essentiellement la guanine, générant des 8-nitroguanines et/ou des groupements déoxyribose (Burney, Niles et al. 1999). Cette oxydation provoque soit l'apparition de sites abasiques ultérieurement clivés par des endonucléases, soit la déstabilisation de la structure de l'ADN (au niveau de la partie sucrée), en ôtant des atomes d'hydrogène. Ces cassures simple brin mènent au final à l'activation de la poly ADP ribose polymérase (PARP), située en aval de voies signalétiques impliquées dans la mort cellulaire et l'inflammation tissulaire (Burney, Caulfield et al. 1999).

### *3.1.2. Effets sur les lipides*

Le peroxynitrite affecte la structure et la fonction des membranes cellulaires de nature lipidique, mais aussi les lipoprotéines, car il favorise la réaction de peroxydation des acides gras polyinsaturés (PUFAs), initiée par soustraction d'un atome d'hydrogène préférentiellement au niveau des doubles liaisons. Il en résulte la génération de dérivés lipidiques radicalaires tels les radicaux hydroperoxy et les diènes conjugués et d'aldéhydes, lesquels peuvent amplifier le stress en réagissant avec d'autres PUFAs (Denicola and Radi 2005). Le peroxynitrite peut aussi altérer la fraction lipidique des LDLs par peroxydation. Ces LDLs modifiées ne sont dès lors plus capables d'assurer leur fonction, résultant en la perturbation de voies de signalisation données et en l'apparition d'événements oxydatifs secondaires. Lorsqu'elles sont oxydées, les LDLs s'accumulent au sein des macrophages, lesquels deviennent dès lors des cellules spumeuses, à la base du développement de plaques athéromateuses et de l'athérosclérose.

### *3.1.3. Effets sur les protéines*

Le peroxynitrite peut oxyder les protéines, ce qui induit de multiples modifications de structure et d'activité, en changeant la charge électrique, la composition en acides aminés ou en augmentant la sensibilité face aux protéases. Par exemple, le peroxynitrite peut rendre une enzyme inactive dans le cas où il cible un groupement prosthétique (contenant des métaux de transition) ou un résidu important dans la structure.

Le peroxynitrite réagirait préférentiellement avec les résidus comportant du soufre (cystéine, méthionine) ou un cycle aromatique (tyrosine, tryptophane, histidine, phénylalanine) (Alvarez, Trujillo et al. 2002). Il peut aussi réagir avec les groupements prosthétiques de certaines protéines (ex : protéines hémiques, protéines à Mn, Cu). Cette interaction se fait soit de manière directe (pour la cystéine, méthionine et tryptophane), soit de manière indirecte (pour la tyrosine) à partir de radicaux libres issus de la décomposition du peroxynitrite, tels  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{NO}_2^\cdot$  et  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  (**Figure I.13A**).

Parmi les modifications les plus connues, figure la nitration des résidus tyrosine, retrouvée *in vivo* et décrite pour pas moins de 40 protéines différentes (Aulak, 2001), par exemple dans le contexte de processus inflammatoires au cours desquels est généré un stress oxydatif (Pfeiffer, Schmidt et al. 2000). La formation de 3-nitrotyrosines (3-NT) est d'ailleurs

considérée comme un biomarqueur de maladies cardiovasculaires, en aval de la formation de peroxynitrite (Reiter, Teng et al. 2000).

La nitration des résidus tyrosine passe par la formation d'un radical tyrosyl, à partir de la réaction entre les radicaux  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{NO}_2\cdot$ ,  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  et le résidu tyrosine (Alvarez, Trujillo et al. 2002). Ce radical tyrosyl mène finalement à la formation de 3-NT (**Figure I.13B**). Souza et son équipe de chercheurs sont parvenus à identifier les différentes conditions favorables à cette nitration. Non seulement le résidu tyrosine doit être accessible pour le peroxynitrite, mais il doit également se retrouver à proximité d'un autre acide aminé chargé et suffisamment éloigné de tout résidu cystéine (Souza, Daikhin et al. 1999). En effet, tel évoqué précédemment, la cystéine fait partie des acides aminés les plus susceptibles de subir une oxydation par le peroxynitrite (S-nitrosylation). La nitration des protéines provoque généralement leur inactivation (ex : PGI2 synthase, MnSOD) mais peut aussi amener un gain de fonction (fibrinogène, protéine kinase  $\epsilon$ ) (Radi 2004). La nitration des tyrosines peut aussi perturber les cascades de signalisation au sein de la cellule, en empêchant des modifications protéiques telle leur phosphorylation (Alvarez, Trujillo et al. 2002).

La formation de 3-NT médiée par le peroxynitrite est relativement complexe (**Figure I.13**). Tout d'abord, le peroxynitrite interagit avec les résidus tyrosine, soit sous forme protonée ( $\text{ONOOH}$ ; acide peroxynitrique), soit sous forme liée au  $\text{CO}_2$  ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ; nitrosocarbonate). La réaction avec le  $\text{CO}_2$  est néanmoins plus fréquemment observée car ce composé gazeux est présent en forte concentration (1,3-1,5 mM) dans la cellule (Alvarez, Trujillo et al. 2002). La nitration de résidus tyrosine induite par le peroxynitrite sous forme d' $\text{ONOOH}$  ou le plus souvent d' $\text{ONOOCO}_2^-$  (car plus rapide) suit la voie dite radicalaire. *In vivo*, la formation de 3-NT induite par l' $\text{ONOOCO}_2^-$  génère indirectement de l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) (Squadrito and Pryor 1998; Squadrito and Pryor 1998). Finalement, cette formation de 3-NT en présence de  $\text{CO}_2$  est possible grâce à la génération d'espèces oxydantes secondaires (Alvarez, Trujillo et al. 2002).

La présence de *scavengers* de peroxynitrite peut empêcher la formation de ces 3-NT. De même, dans des modèles d'étude *in vitro*, l'absence de  $\text{CO}_2$  réduit la formation de 3-NT. Par ailleurs, il existe d'autres mécanismes de nitration. Ceux-ci font intervenir, par exemple, la réaction de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  avec le  $\text{NO}_2\cdot$ , catalysée par la myéloperoxydase (Eiserich, Hristova et al. 1998) ou encore une oxydation subséquente à la combinaison du  $\text{NO}\cdot$  avec le radical tyrosyl (Gunther, Hsi et al. 1997).

A titre d'information, il a été montré que de faibles concentrations en peroxynitrite ( $\leq 5 \mu\text{M}$ ) ajoutées dans des solutions tampons *in vitro* peuvent donner lieu à la formation de dityrosines alors que le peroxynitrite présent en forte concentration favorisera davantage celle de 3-NT (Pfeiffer, Schmidt et al. 2000).

### 3.2. Effets indirects – Le peroxynitrite en tant que messenger secondaire

Le peroxynitrite est relativement bien connu pour ses effets toxiques, mentionnés précédemment. Cependant, le peroxynitrite peut également agir comme messenger secondaire activant des voies défensives, telles les voies Nrf2 et UPR, reprises ci-dessous.

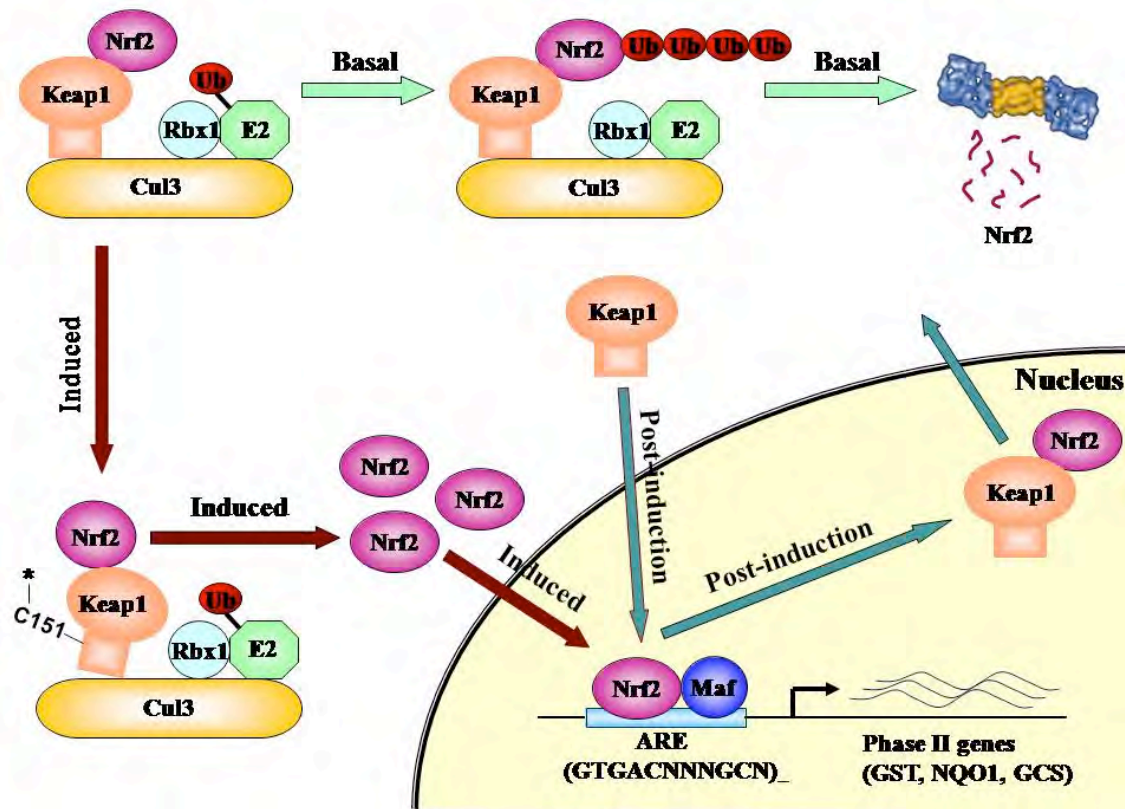
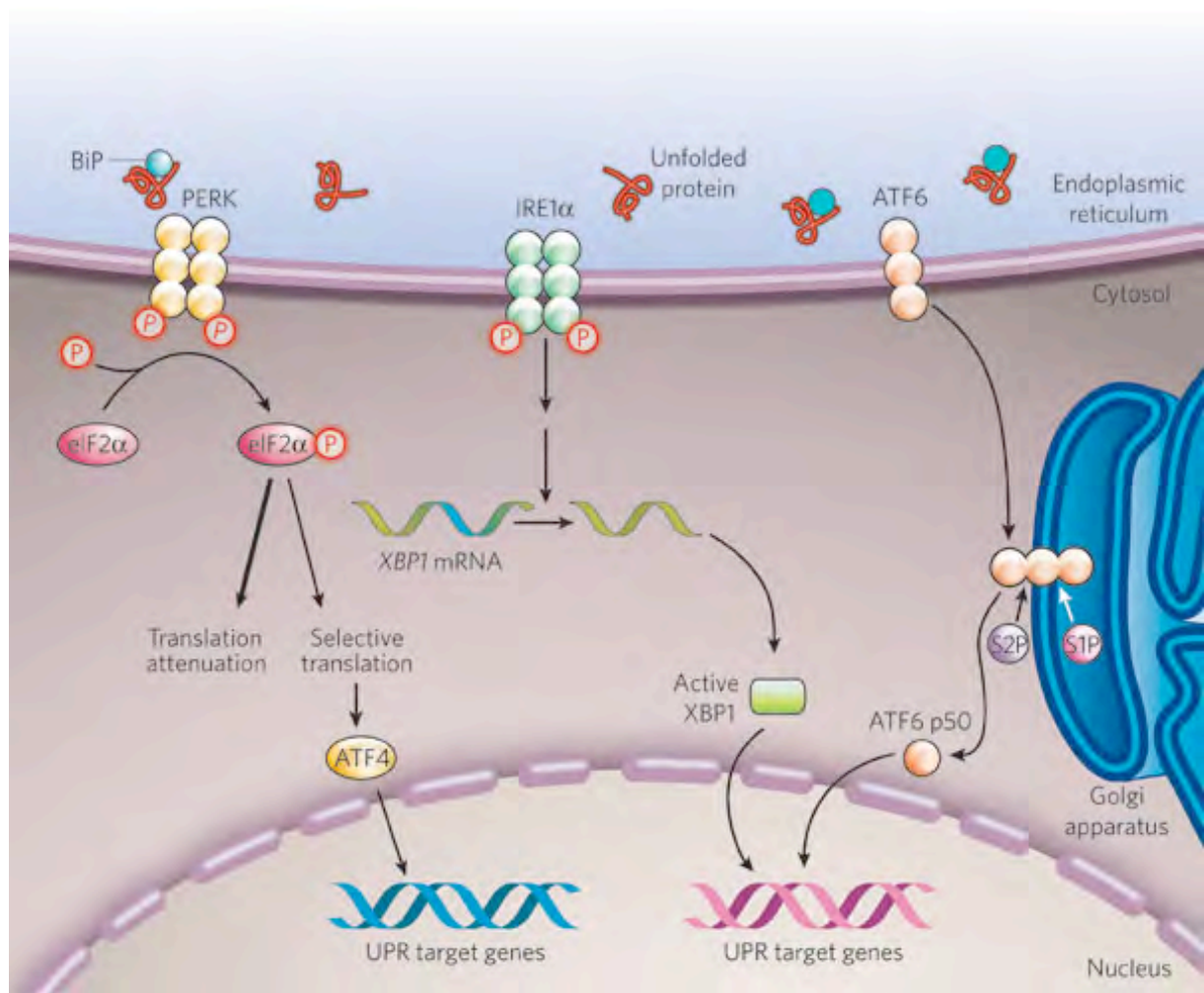


Figure I.14. – Activation de la voie Nrf2 en conditions de stress  
<http://www.u.arizona.edu/~zhangd/RESEARCH.html>





**Figure I.15. – Activation de la voie UPR en conditions de stress (Zhang and Kaufman 2008)**

### 3.2.1. Activation de la voie de Nrf2

En l'absence de stress oxydatif, le facteur Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) forme un complexe avec la protéine Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1) dans le cytosol. Keap1 possède un domaine BTB directement lié à une enzyme impliquée dans l'ubiquitinylation, ce qui assure une ubiquitinylation constitutive de Nrf2 et donc sa dégradation par le protéasome (Furukawa and Xiong 2005). Un 2<sup>e</sup> complexe, formé par la petite protéine Maf (musculo aponeurotic fibrosarcoma) et son répresseur Bach1 subsiste dans le noyau. Ce complexe reste lié aux séquences ARE (antioxidant responsive element), présentes dans les promoteurs de nombreux gènes, empêchant leur transcription.

En conditions stressantes, il y a dissociation du complexe Nrf2-Keap1 d'une part et du complexe Maf-Bach1, d'autre part. En effet, Keap1 subit un changement de conformation, par oxydation de cystéines rédox-sensibles, libérant Nrf2. L'activation de Nrf2 peut également requérir des phosphorylations de la protéine, variables selon les types cellulaires. La forme activée de Nrf2 transloque alors dans le noyau (**Figure I.14**) où Maf suite au stress oxydatif, est libérée de son répresseur Bach1. Nrf2 peut donc se dimériser avec Maf et s'associer à des molécules coactivatrices, pour se lier aux séquences ARE de l'ADN. Cette liaison à l'ADN mène finalement à la transcription de gènes antioxydants et détoxifiants tels *hmx-1* et *NQO1*. L'activation de la voie Nrf2 se traduit donc par l'accumulation du facteur Nrf2 au niveau du noyau, ce qui permet d'induire l'expression de différents gènes assurant des rôles protecteurs vis-à-vis de la cellule. Cette voie Nrf2 peut notamment être activée par le peroxy-nitrite (Kang, Choi et al. 2002; Li, Cha et al. 2006).

Par ailleurs, il a été montré qu'un stress au niveau du RE (voir point 3.2.2.1.) engendrait également l'activation du gène *hmx-1*, via la voie Nrf2. Pour ce faire, les auteurs ont eu recours à la technique de l'EMSA dans laquelle ils ont utilisé une sonde ARE complémentaire au promoteur du gène *hmx-1* murin et observé le retard sur gel correspondant à la liaison Nrf2-ARE (Liu, Peyton et al. 2005).

### 3.2.2. Activation de la voie UPR

#### 3.2.2.1. UPR, en tant que voie défensive

En conditions normales, le réticulum endoplasmique (RE) permet le transport, la synthèse, certaines modifications post-traductionnelles et le bon repliement des protéines de la voie sécrétoire (Schroder 2008). Le bon repliement des protéines est assuré par des protéines chaperonnes (foldases, holdases, ...) présentes au sein de la lumière du RE, dont Grp78/BiP (Glucose-regulated protein 78) qui est majoritaire et Grp94. Lorsque des protéines mal repliées s'accumulent dans la lumière du RE, il en résulte un stress du RE, ce qui active la voie UPR (unfolded protein response) (**Figure I.15**). Parmi les stress connus pour activer la voie UPR figurent notamment les stress oxydatifs ou l'hypoxie. La voie UPR peut aussi être activée *in vitro* à l'aide de différentes molécules telles l'HCy, la bréfeldine A (inhibant le transport du RE au Golgi), la thapsigargine (empêchant le fonctionnement des canaux calciques du RE) ou encore la tunicamycine (inhibant la N-glycosylation des protéines)(Rao, Hermel et al. 2001).

La voie UPR une fois activée a pour objectif de permettre à la cellule de faire face à l'accumulation de protéines mal repliées. Elle peut d'ailleurs entraîner l'apoptose en cas de stress du RE trop intense et/ou prolongé (Oyadomari and Mori 2004) (voir point 3.2.2.2). En

## INTRODUCTION

---

conditions normales Grp78/Bip se lie à IRE1, PERK et ATF6, les maintenant inactives. En cas de stress du RE, les protéines mal repliées s'accumulent et recrutent Grp78/Bip qui se détache de IRE1, PERK et ATF6, ce qui permet l'activation de ces 3 voies de signalisation (levée d'inhibition) et déclenche l'UPR.

Lors de l'activation de la voie IRE1 (inositol requiring enzyme 1), la protéine IRE1 active se dimérise et induit la transcription de XBP-1 (XhoI site-binding protein 1). En fait, l'activité RNase de la protéine IRE1 active va conduire au *splicing* de l'ARNm précurseur de XBP-1 en une forme mature et ainsi permettre la synthèse de XBP-1 (Oyadomari and Mori 2004). XBP-1 va finalement induire l'expression de protéines chaperonnes et favoriser la dégradation de certaines protéines mal repliées. PERK (pancreatic endoplasmic reticulum kinase) une fois activée, acquiert son activité kinase. PERK est une kinase qui phosphoryle le facteur eIF2 $\alpha$  (eucaryotic initiation factor 2). Cette phosphorylation inhibe la traduction de manière générale mais certains ARNm échappent à cette inhibition, tel l'ARNm encodant ATF4. La protéine ATF4 (activated transcription factor 4), un facteur de transcription, s'accumule, assurant la transcription de gènes codant des protéines chaperonnes. Quant à la voie ATF6 (activated transcription factor 6), elle implique la migration de la protéine ATF6 vers l'appareil de Golgi. Au niveau de cet organite, les sérines protéases S1P et S2P (Site 1-/2- proteases) clivent ATF6, ce qui permet son activation. Finalement, la protéine ATF6 active migre dans le noyau où elle se dimérise et régule la transcription de gènes codant des chaperonnes, mais également des gènes impliqués notamment dans la vasodilatation et la transcription de la protéine CHOP (voir point 3.2.2.2.) (Oyadomari and Mori 2004).

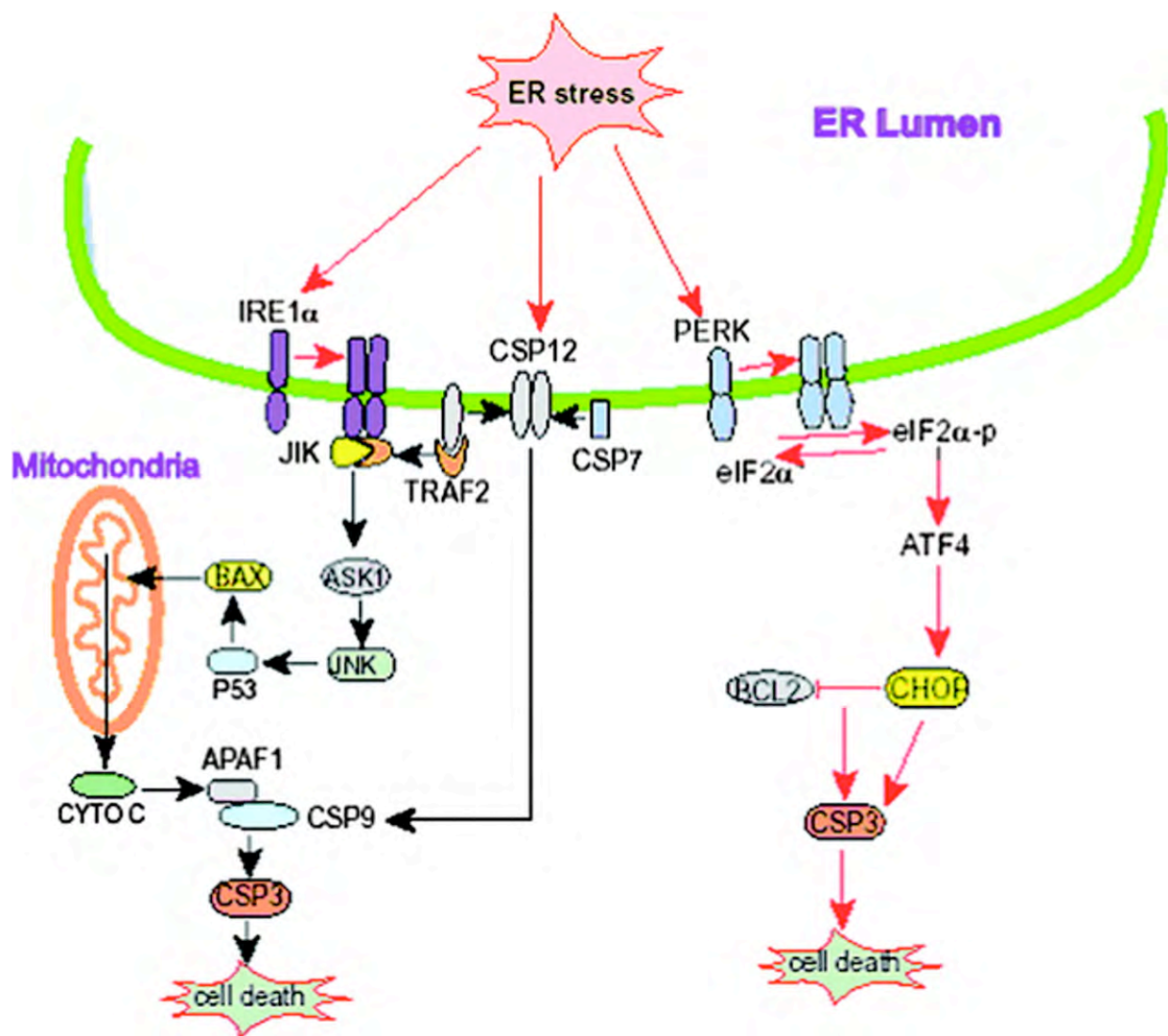
Au final, ces 3 voies de signalisation convergent au niveau du noyau en vue d'induire la transcription accrue de gènes cibles de la voie UPR. Parmi ces gènes figurent *Grp78* et *Grp94*, codant toutes 2 pour des protéines chaperonnes pour favoriser le bon repliement des protéines. En parallèle, le système ERAD (ER-associated degradation) va également être mis en place, permettant la dégradation des protéines mal repliées par le complexe du protéasome. Dickhout *et al.* (2005) ont d'ailleurs montré sur un modèle de cellules endothéliales en culture que le peroxy-nitrite activait cette voie UPR (Dickhout, Hossain et al. 2005).

Si la voie UPR induit bien une réponse protectrice vis-à-vis de la cellule dans un premier temps, elle peut aussi aboutir à la mort cellulaire en cas de stress trop intense ou prolongé.

### 3.2.2.2. UPR et mort cellulaire

Parmi les voies apoptotiques médiées par le RE (Kim, Emi et al. 2006) figure la voie impliquant la protéine CHOP (CCAAT/enhancer protein (C/EBP) homologous protein), aussi appelée GADD153 (Growth arrest and DNA-damage-inducible gene 153). Sa cascade de signalisation est encore méconnue à l'heure actuelle.

La protéine nucléaire CHOP se dimérise avec différents facteurs de transcription appartenant à la famille C/EBP (Mayerhofer and Kodym 2003). Cette protéine intervient lors de stress divers de la cellule tels le stress oxydatif, le stress du RE ou encore face à une privation de sérum. Bien qu'il soit essentiellement considéré comme étant un facteur pro-apoptotique, CHOP semble aussi pouvoir exercer des effets anti-apoptotiques lorsqu'il est surexprimé. En effet, Guyton *et al.* (1996) ont montré que la résistance induite dans des fibroblastes soumis à un stress oxydatif était liée à une surexpression de CHOP (Guyton, Spitz et al. 1996). De plus, en 2001, des chercheurs ont montré que lorsque CHOP était



**Figure I.16. – Stress du RE et apoptose médiée par CHOP.** En cas de stress du RE trop intense ou prolongé, l'UPR peut déclencher des voies apoptotiques, entre autres via CHOP ([http://www.neurology.org/content/vol66/1\\_suppl\\_1/images/large/69FF3.jpeg](http://www.neurology.org/content/vol66/1_suppl_1/images/large/69FF3.jpeg)).

## INTRODUCTION

---

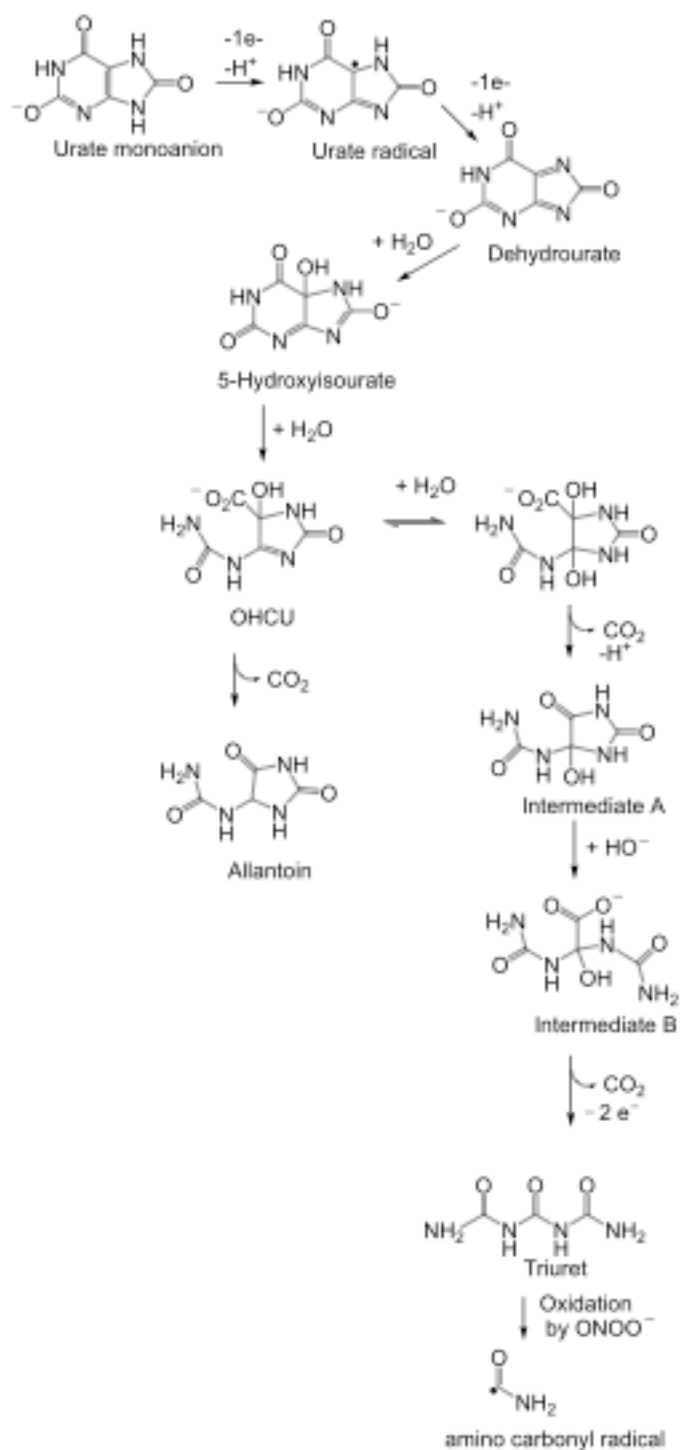
surexprimé après transfection de cellules de carcinome mammaire, celles-ci résistaient mieux à l'apoptose induite par une privation en sérum (Mertani, Zhu et al. 2001). De même, l'hormone de croissance protège ces cellules contre l'apoptose, via l'induction de CHOP. Enfin, Mayerhofer et son équipe (2003) ont également observé dans des cellules de lymphomes murins radiosensibles que la surexpression du gène CHOP atténuait fortement la réponse apoptotique préalablement générée par des rayons X, leur conférant une certaine résistance face à ces rayons (Mayerhofer and Kodym 2003). Bien que peu nombreux, certains auteurs ont donc récemment émis l'hypothèse d'un effet protecteur anti-apoptotique de CHOP. Cette hypothèse sera d'ailleurs envisagée et étudiée dans de ce mémoire (**Figure I.16**).

Par ailleurs, depuis récemment, des chercheurs se sont intéressés au lien pouvant exister entre l'activation de la voie UPR et le processus d'autophagie.

L'autophagie est un processus conservé d'auto-défense cellulaire, impliquant les lysosomes, activé lors de divers stress (jeûne, carences énergétiques, ...) et visant à rétablir l'homéostasie de la cellule (recyclage des constituants cellulaires, élimination des déchets toxiques, survie cellulaire,...). L'autophagie est présente sous 3 formes; la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) et la macroautophagie (la plus connue) (Martinet, Agostinis et al. 2009). Lors de la microautophagie, il y a invagination de la membrane lysosomale et internalisation des protéines cytosoliques qui se font dégrader par des hydrolases lysosomales. Au cours de l'autophagie médiée par les chaperonnes, il existe des interactions entre les chaperonnes de type HSP (heat shock protein) et des protéines mal repliées. Celles-ci sont alors transportées vers la lumière du lysosome où elles seront soumises à l'activité d'hydrolases lysosomales. Quant à la macroautophagie, elle commence par la formation d'un phagophore qui enferme différents éléments cellulaires (portion de cytoplasme, protéines à demi-vie élevée, organites défectueux) dans une vésicule à double membrane, l'autophagosome. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes (ou des endosomes), devenant des autophagolysosomes (à pH plus acide). Ces autophagolysosomes dégradent alors le matériel ainsi séquestré, après induction de voies signalétiques données.

Lors d'un stress du RE, impliquant l'activation de la voie UPR, il a été montré que le processus autophagique était également déclenché en vue d'une survie cellulaire. Cependant, l'interaction entre l'autophagie et l'activation de la voie UPR reste encore méconnue à l'heure actuelle. Certains chercheurs se sont d'ailleurs demandés si la voie UPR ne pouvait pas exercer un contrôle sur l'autophagie (Li, Ni et al. 2008). En effet, d'après leurs résultats, *Grp78*, un des gènes cibles de la voie UPR, semble être requis pour la régulation du processus autophagique.

Suivant sa concentration, le peroxynitrite est donc une molécule assurant des rôles diamétralement opposés dans la cellule. D'une part, le peroxynitrite peut agir comme messenger secondaire, en activant notamment les voies défensives cytoprotectrices Nrf2 et UPR. D'autre part, le peroxynitrite exerce aussi des effets cytotoxiques et joue un rôle clef dans le dysfonctionnement endothélial associé à nombreuses maladies cardiovasculaires, comme nous l'avons vu au point 1.



**Figure I.17. – Oxydation de l’acide urique en présence de peroxynitrite** (Robinson, Morre et al. 2004)

### 4. Systèmes de détoxification du peroxynitrite

Il existe un certain nombre de systèmes mis en place par la cellule afin de détoxifier le peroxynitrite. Parmi ces systèmes de détoxification, figurent les défenses antioxydantes et l'acide urique.

#### 4.1 Molécules antioxydantes à large spectre

En conditions physiologiques, la génération de faibles quantités de peroxynitrite peut être régulée par la présence de défenses antioxydantes (Radi, Cassina et al. 2002). Parmi les molécules connues pour détoxifier le peroxynitrite, figurent le glutathion, l'albumine, la cystéine et l'hémoglobine, lesquelles comportent toutes un groupement thiol (-SH) (Ronson, Nakamura et al. 1999). La réaction entre le peroxynitrite et ces groupements thiols résultent en la régénération de  $\text{NO}^\cdot$  via la formation d'intermédiaires thiolés (nitrosothiols). Ces 2 produits de réaction, soit le  $\text{NO}^\cdot$  et les nitrosothiols, parviennent finalement à combattre l'inflammation par l'induction de la vasorelaxation et la réduction de l'adhérence des PMN à l'endothélium activé (Ronson, Nakamura et al. 1999).

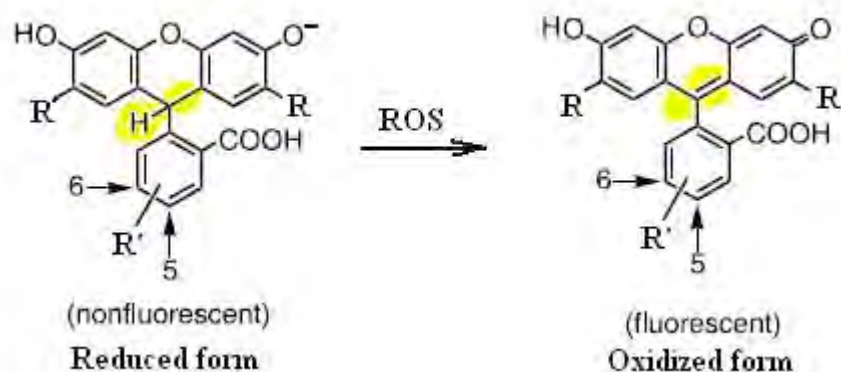
#### 4.2. Acide urique

L'acide urique est un métabolite plasmatique généré lors du métabolisme des purines. Il s'agit d'un *scavenger* du peroxynitrite bien connu, de part ses propriétés antioxydantes, et ce d'autant plus lorsque le  $\text{CO}_2$  est présent. L'urate oxydase est une enzyme catalysant la dégradation de l'acide urique et est présente chez de nombreux mammifères mais absente chez l'Homme. Cette enzyme n'est cependant pas présente chez l'Homme, ce qui se traduit par une forte accumulation d'acide urique dans la cellule, à raison de 200-500 nM (Cutler 1984; Robinson, Morre et al. 2004). Néanmoins, à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , l'acide urique constitue un antioxydant efficace qui réagit avec les radicaux hydroxyles, ce qui génère des produits intermédiaires stables. À titre d'exemple, l'acide urique peut inhiber la nitration sur résidus tyrosine induite par le peroxynitrite (Robinson, Morre et al. 2004). Cependant, à de plus fortes concentrations, l'acide urique est connu pour assurer un rôle pro-oxydant (ex : réaction avec lipides) : au plus la concentration en acide urique augmente dans le sang, au plus le stress oxydatif et le risque de développer des maladies cardiovasculaires est important (Benzie and Strain 1996).

*In vivo*, l'acide urique est oxydé par le peroxynitrite, ce qui se traduit par une « libération de radicaux libres et de consommation d'oxygène ». Il en résulte la formation de 2 produits de réaction : « un dérivé azoté capable de libérer du  $\text{NO}^\cdot$  et un autre intermédiaire radicalaire » (Santos, Anjos et al. 1999). Il semblerait que l'acide urique réagisse davantage avec le peroxynitrite sous forme  $\text{ONOOH}$ , inhibant le processus de nitration sur résidus tyrosine induite par le peroxynitrite (Robinson, Morre et al. 2004). Par ailleurs, l'acide urique pourrait également réagir avec d'autres molécules, issues de la décomposition du peroxynitrite. Cela génère d'autres produits de réaction, à leur tour susceptibles de réagir ultérieurement avec le peroxynitrite.

Lors du mécanisme d'oxydation de l'acide urique, celui-ci se décompose tout d'abord en déhydrourate, en passant par une forme radicalaire, grâce à la présence « d'intermédiaires radicalaires issus du  $\text{ONOOH}$  ou du  $\text{ONOOCO}_2^\cdot$  » (Robinson, Morre et al. 2004) (**Figure I.17**). Le déhydrourate subit ensuite une attaque nucléophile, ce qui entraîne la formation de 5-hydroxyisourate, un intermédiaire instable rapidement hydrolysé pour donner du 2-oxo-4-





**Figure I.18. – Structure de la sonde HPF**  
<http://molecularprobestechnologynetwork.community.invitrogen.com>

**Reactivity Profile of APF/HPF:**

ROS (RFU)	HPF (RFU) Ex:499 Em:515	APF (RFU) Ex:499 Em:515	DCFH-DA (RFU) Ex:500 Em:520
Hydroxyl Radical: $\cdot\text{OH}$	730	1200	7400
Peroxynitrite: $\text{ONOO}^-$	120	560	6600
Hypochlorite: $\cdot\text{OCl}$	6	3600	86
Oxygen Radical: $\cdot\text{O}_2$	5	9	26
Superoxide: $\text{O}_2^{\cdot-}$	8	6	67
Hydrogen Peroxide : $\text{H}_2\text{O}_2$	2	<1	190
Nitric Oxide: $\text{NO}$	6	<1	150
Alkylperoxyl Radical: $\text{ROO}^\cdot$	17	2	710
Autoxidation	<1	<1	2000

**Tableau I.1. – Comparaison de la sensibilité et de la spécificité des sondes HPF, APF et DCFH-DA** (<http://www.celltechnology.com/products/Ocldetection.htm>)



hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline. Après 2 étapes intermédiaires de réaction, du triuret peut être généré suite à une réaction de décarboxylation (perte d'un groupement  $\text{CO}_2$ ). Enfin, ce composé triuret peut subir une réaction d'oxydation induite notamment par le peroxyxynitrite, pour finalement permettre la formation du radical aminocarbonyl (Robinson, Morre et al. 2004).

En conditions pathophysiologiques, la production d'acide urique augmente fortement. Il en résulte la formation de l'espèce radicalaire aminocarbonyl, laquelle dépend donc de la présence de peroxyxynitrite et semble dès lors favoriser l'effet pro-oxydant de l'acide urique (Santos, Anjos et al. 1999). Cependant, il ne faut pas exclure l'implication d'autres intermédiaires également responsables de la formation d'aminocarbonyl : de nombreuses voies de signalisation et la participation éventuelle d'autres acteurs moléculaires dans l'oxydation de l'acide urique demeurent encore méconnus à l'heure actuelle.

### 5. Détection du peroxyxynitrite

Afin de confirmer la présence de peroxyxynitrite et d'en étudier les effets au niveau des cellules, différents outils de détection de peroxyxynitrite *in vitro* ont été développés. Ainsi, il existe des méthodes directes de détection de peroxyxynitrite, telle l'utilisation de sondes fluorescentes plus ou moins spécifiques, ou indirectes, telle la détection des 3-NT.

#### 5.1. Détection directe de peroxyxynitrite

Il existe de nombreuses sondes fluorescentes développées dans le but de détecter des ROS, dont le peroxyxynitrite. Parmi celles-ci, signalons les sondes DHR (Dihydrorhodamine 123), DCFH (2,7-Dichlorodihydrofluorescéine), Rhodamine B Hydrazide et HPF (2-[6-(4-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid) (Gomes, Fernandes et al. 2006).

##### 5.1.1. La sonde DHR

La dihydrorhodamine 123 diffuse aisément au travers des membranes cellulaires grâce à son caractère lipophile (Gomes, Fernandes et al. 2006). Le mécanisme d'oxydation de cette sonde reste méconnu. Certains auteurs proposent une oxydation directe de la dihydrorhodamine 123 par le peroxyxynitrite, ce qui conduit à l'émission de fluorescence par la rhodamine 123. D'autres suggèrent une interaction indirecte avec la sonde, de part la décomposition du peroxyxynitrite en  $\text{OH}^\cdot$  et en  $\text{NO}_2^\cdot$  (Jourdeuil, Jourdeuil et al. 2001)

##### 5.1.2. La sonde DCFH

Au départ conçue pour détecter de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , cette sonde s'avère également utile dans la détection d'autres ROS, dont le peroxyxynitrite (Gomes, Fernandes et al. 2006). La génération de peroxyxynitrite à l'aide d'un donneur, tel le SIN-1, est responsable d'une oxydation importante de la sonde DCFH. La fluorescence résultante provient de la formation du produit DCF. Il semblerait que la sonde DCFH soit plus sensible au peroxyxynitrite, comparé à la sonde DHR. Néanmoins, cette sonde DCFH semble être peu spécifique au peroxyxynitrite puisqu'elle détecte divers ROS/RNS présents (Gomes, Fernandes et al. 2006) (**Tableau I.1**).

### 5.1.3. La sonde Rhodamine B Hydrazide

La rhodamine B hydrazide est un dérivé de la rhodamine et peut également être oxydée en présence de peroxy-nitrite. Parmi ses avantages, cette sonde est photostable et insensible au pH, contrairement aux 2 sondes précédemment mentionnées (Gomes, Fernandes et al. 2006).

### 5.1.4. La sonde HPF

L'acide 2-[6-(4-Hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoïque est une molécule dérivée de la fluorescéine. La sonde HPF (ou 3'-(p-Hydroxyphényl) fluorescein) (**Figure I.18**) a été conçue en 2003 (Setsukinai, Urano et al. 2003) et est très sélective puisqu'elle détecte préférentiellement la présence de ROS très réactifs (peroxy-nitrite, OH<sup>•</sup> et HOCl) (Gomes, Fernandes et al. 2006). De part sa haute résistance à l'autooxydation et sa sélectivité, la sonde HPF présente des avantages non négligeables comparé aux autres sondes (**Tableau I.1**).

De plus, l'ajout de *scavengers* de radicaux libres et/ou d'inhibiteurs spécifiques d'enzymes dans le milieu permet la distinction entre l'oxydation de la sonde par le peroxy-nitrite et celle induite par d'autres ROS. Par exemple, la sonde HPF peut être mise en présence d'acide urique pour vérifier que l'oxydation est bien due au peroxy-nitrite.

## 5.2. Détection indirecte de peroxy-nitrite par la formation de 3-NT

Une autre manière de mettre en évidence la formation de peroxy-nitrite est l'étude de la formation de 3-NT (mentionnée au point 3.1.3.), une conséquence indirecte due à la présence de peroxy-nitrite dans les cellules. La technique du Western blot constitue une approche simple et intéressante de part l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces 3-NT. Par ailleurs, il existe aussi des anticorps anti 3-NT développés pour détecter la formation de peroxy-nitrite en immunofluorescence.

Comme les 3-NT sont des produits stables, elles peuvent également être analysées par spectrométrie de masse qui permettent en outre d'identifier les protéines porteuses des 3-NT (Petersson, Steen et al. 2001). Enfin, il existe aussi une nouvelle méthode électrochimique récemment mise au point pour détecter la présence de 3-NT (Bedioui, Quinton et al. 2010).

### 6. Objectifs du mémoire

La signification biologique et les rôles du peroxynitrite sont donc complexes et probablement ambivalents au sein de la cellule. En effet, le peroxynitrite peut être cytotoxique d'une part, en réagissant avec l'ADN, les lipides et les protéines, menant à la mort de la cellule. D'autre part, à de faibles concentrations, le peroxynitrite peut également jouer un rôle de second messager. Une étude en cours, au sein de notre laboratoire (thèse de Laurine Mattart) a démontré que le SIN-1, un donneur de peroxynitrite connu, était capable d'induire une réponse cytoprotectrice, via l'activation de 2 voies majeures de cytodéfense, la voie Nrf2 et la voie UPR. De nombreux papiers ont ainsi étudié les effets du peroxynitrite sur les cellules endothéliales. *In vitro*, les cellules endothéliales peuvent être exposées soit à du peroxynitrite purifié, soit à un donneur de peroxynitrite, tel que le SIN-1 (Mattart *et al.*, en révision). *In vivo*, la situation est plus complexe, mais différents traitements ou conditions expérimentales sont connus pour favoriser la formation de peroxynitrite.

Ce mémoire comporte deux volets bien distincts. **Dans la première partie, nous avons essayé de mettre au point des conditions expérimentales en culture plus physiologiques que la simple addition d'un donneur de peroxynitrite, le SIN-1, pour induire une génération suffisante de peroxynitrite.** Il s'agit d'une demande d'un des *reviewers* pour l'article soumis par Laurine Mattart *et al.* Pour ce faire, nous avons eu recours à l'utilisation de molécules ou de systèmes décrits dans la littérature comme générant du peroxynitrite. Nous nous sommes focalisés sur l'homocystéine, l'hypoxie-réoxygénation, les MoxLDLs et l'angiotensine-II, qui nous semblaient les plus pertinents dans le contexte d'un dysfonctionnement endothélial. Pour s'assurer qu'il y a bien formation de peroxynitrite, nous avons utilisé les sondes HPF et H<sub>2</sub>DCFDA, mais nous avons aussi suivi l'activation de Nrf2, l'induction de la *hmx-1* et la formation de 3-NT, en utilisant le SIN-1 comme contrôle positif. Cette étude a été réalisée sur la lignée EAHy926, mais aussi sur des HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells), cellules endothéliales en culture primaire. Malheureusement ces mises au point se sont avérées beaucoup plus difficiles que prévu, même si nous avons fini par obtenir des résultats très encourageants avec l'angiotensine II, combinée avec un donneur de NO.

**Dans la deuxième partie du mémoire, nous avons poursuivi l'étude des effets bénéfiques du peroxynitrite ainsi que des mécanismes protecteurs qu'il implique, au niveau de cellules endothéliales, en revenant au modèle expérimental avec le SIN-1.** Nous avons d'abord étudié l'effet du peroxynitrite sur des cellules endothéliales après privation de sérum et stimulation au SIN-1 en vérifiant l'effet protecteur (par des tests d'activité caspase-3 et de fragmentation de l'ADN) et en suivant les variations d'expression génique (par cartes microfluidiques, RT-PCR en temps réel et Western blot). Par la suite, nous nous sommes focalisés sur l'activation de la voie UPR, en étudiant l'expression des gènes *BiP*, *Grp94* et *CHOP* (Western blot, RT-PCR en temps réel). Enfin, nous avons clôturé ce mémoire en étudiant le rôle possible de *CHOP*, dans les effets protecteurs du SIN-1 en procédant à son invalidation via l'approche des siRNA. En effet, bien que généralement décrit dans la littérature comme facteur pro-apoptotique, *CHOP* pourrait aussi avoir des effets anti-apoptotiques dans certains contextes.

Ce modèle de stimulation des cellules endothéliales avec le SIN-1 nous a finalement permis de confirmer que dans certaines conditions le peroxynitrite peut avoir des effets bénéfiques au niveau de la cellule endothéliale, en menant à l'activation de la voie Nrf2 et de la voie UPR, deux voies cytoprotectrices majeures.

## II. MATERIELS ET METHODES

<b>Lignées cellulaires</b>	<b>Sources</b>
EAhy926	Dr Edgell ; South Carolina University ; USA
HUVECs	Lonza ou Sigma

**Tableau II.1. – Lignées cellulaires utilisées lors de ce mémoire**

	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
Boîtes de culture stériles de 25 cm <sup>2</sup> (T25) ou de 75 cm <sup>2</sup> (T75)	-	CORNING® Flasks
Milieu de culture DHG-sérum stérile (4 °C)	Milieu DMEM (réf. 41966) + FBS 10 %	Gibco ; Royaume-Uni
Milieu de culture EGM stérile (4°C)	Milieu EBM + GA-1000 + BBE + Hydrocortisone + rhEGF + FBS 10 %	Gibco; Royaume-Uni
PBS stérile (4 °C)	-	Lonza BioWhittaker®
Trypsine-EDTA stérile (-20 °C)	0,05% Trypsine + 0,53 mM EDTA	Gibco ; Royaume-Uni
Tubes stériles de 10 ml	-	
Centrifugeuse (T°A)	-	Eppendorf Centrifuge 5702

**Tableau II.2. – Matériel et réactifs utilisés pour repiquer les cellules EAhy926 ou les HUVECs**

	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
DHG-L1 (4 °C)	DMEM (réf. 51200)	Gibco ; Royaume-Uni
SIN-1 (3-morpholinosydnonimine hydrochloride) (-20 °C)	Fiole de SIN-1 (1mg)  <u>Solution stock 10 mM :</u>  485 µl HBSSc/fiole de SIN-1  <u>Solution stock 30 mM :</u>  161 µl HBSSc/fiole de SIN-1	Invitrogen
HBSS (4 °C)	0,137 M NaCl + 5,36 mM KCl + 440 nM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 5 mM glucose + 299 nM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O + 4,2 mM NaHCO <sub>3</sub>	Fraîchement préparé
HBSS complet (T°A)	HBSS + 0,16 M MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O + 0,24 M CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O pH 7,35	Fraîchement préparé
Angiotensine-II (-20 °C)	<u>Solution stock 1 mM :</u>  Angiotensine-II (poudre) à resuspendre dans du milieu EBM	Sigma-Aldrich
Acide urique (-20 °C)	<u>Solution stock 50 mM :</u>  Acide urique (poudre) resuspendu dans du NaOH	Sigma

**Tableau II.3. – Matériel et réactifs utilisés pour stimuler les cellules EAhy926 ou les HUVECs**

## II. MATERIELS ET METHODES

### 1. Lignées cellulaires et culture

L'essentiel de ce mémoire a été réalisé sur des cellules endothéliales EAhy926 en culture. Les cellules EAhy926 sont des cellules hybrides dérivées de la fusion de cellules épithéliales A549 de carcinome pulmonaire avec des HUVECs. Par ailleurs, des cellules HUVECs ont également été utilisées.

#### 1.1. Repiquage des cellules

##### Matériel et réactifs

Voir Tableaux II.1. et II.2.

##### *1.1.1 Repiquage des cellules HUVECs*

Les cellules HUVECs sont repiquées en T25 dans 5 ml de milieu EGM et placées en étuve, à 37 °C (5 % de CO<sub>2</sub>). On ne peut les repiquer qu'un nombre limité de fois, car elles se différencient au cours des repiquages (max. 15 PDL).

##### *1.1.2. Repiquage des cellules EAhy926*

Les cellules EAhy926 sont repiquées en T75, à raison de 3x par semaine, dans 15-20 ml de milieu DHG-sérum/T75 et placées en étuve, à 37 °C (avec 5 % de CO<sub>2</sub>). Lors du repiquage, les cellules sont d'abord rincées 2x dans 7 ml de PBS stérile préchauffé afin d'inactiver le sérum. Ensuite, les cellules sont incubées en étuve sèche (37 °C; 3 min) en présence de trypsine préchauffée pour les décrocher. Puis, les cellules sont resuspendues dans 9 ml de DHG sérum. Le tout est récupéré en tube de 10 ml et centrifugé (5 min; 1.000 rpm). Après centrifugation, le culot cellulaire est débarrassé de son surnageant et resuspendu dans 10 ml de DHG-sérum. Enfin, le contenu du tube de 10 ml est réparti en T75 dans un certain volume de DHG-sérum préalablement ajouté, de sorte à obtenir un volume final de 15 ml (en semaine) ou 18 ml (le week-end) par T75. Habituellement, on fait un repiquage 1/2 (5 ml de suspension dans 10 ml de DHG sérum) en semaine et 1/3 (3,3 ml de suspension dans 14,7 ml de DHG sérum) le week-end.

Pour les expériences, les cellules sont repiquées en T25 ou en plaque 24 puits en veillant à travailler toujours avec la même densité cellulaire. Les cellules sont comptées après trypsinisation à l'aide de la chambre de Neubauer. Les cellules sontensemencées à raison de 700.000 à 800.000 cellules par T25 et de 80.000 à 100.000 cellules par puits en plaque 24 puits.

#### 1.2. Stimulation des cellules EAhy926

##### Matériel et réactifs

Voir Tableau II.3.

	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
PBS froid stérile	-	Lonza BioWhittaker®
Racloirs stériles non pyrogéniques	-	SPL Life Sciences
Tampon de lyse TRIS-HCl frais	TRIS 62,5 mM pH 6,8 + SDS 2% + glycérol 10% + DTT 50 mM	Merck ; Allemagne
Tampon de lyse DLA (-20°C)	Urée 7 M + Thiourée 2 M + CHAPS 4% + Tris(hydroxyméthyl)amino méthane 30 mM pH 8,5 + PIC 0,16% (1,6 µl/ml)	Merck ; Allemagne
Tampon de lyse RIPA (4°C)	TRIS-HCl 50 mM pH 7,4 + NaCl 150 mM + Triton X-100 1% + SDS 0,1 % + DOC 1%	Merck ; Allemagne
Microtubes (1,5 ml)	-	SARSTEDT ; Allemagne
Sonicateur à ultrasons (T°A)	-	Vibra cell Sonics&Materials
Plaque agitatrice (8°C)	-	Eppendorf Thermomixer comfort (1,5 ml)
Centrifugeuse (4°C)	-	Eppendorf centrifuge 5415R

**Tableau II.4. – Matériel et réactifs utilisés pour extraire les protéines**

<b>Dosage protéique</b>	<b>Composition des produits</b>	<b>Sources</b>
Tubes à essai	-	Kartell
BSA (1 µg/µl)	-	Thermo Fisher Scientific; USA
Solution de Bradford (5x concentrée)	-	Bio-Rad, USA
Eau milliQ	-	Millipore
Vortex MS2500	-	MS2 Minishaker IKA® labo-moderne
Spectrophotomètre (595 nm)	-	Ultrospec 2100 pro

**Tableau II.5. – Matériel et réactifs utilisés pour doser les protéines par la méthode de Bradford**



### Méthode

Avant toute stimulation, les cellules sont rincées 1x dans 2-5 ml de DHG-L1, puis mises au repos dans 5 ml de DHG-L1 sans sérum.

Lors de ce mémoire, les agents de stimulation utilisés sont essentiellement le SIN-1 (1 mM ; 5 mM) mais aussi l'angiotensine-II (1  $\mu$ M ; 2  $\mu$ M). Par ailleurs, l'acide urique (AU) a également été utilisé (1 mM ; 5 mM) en tant que *scavenger* de peroxy-nitrite. Enfin pour induire une production de peroxy-nitrite plus physiologique, les cellules ont également été soumises à un cycle d'hypoxie-réoxygénation, comme décrit au point 7.

## **2. Extraction protéique**

### Matériel et réactifs

Voir Tableau II.4.

### Méthodes

#### 2.1. Extraction avec le tampon de lyse TRIS-HCl

Les cellules préalablement stimulées en T25 (voir point 1.2.) sont rincées 2x avec du PBS froid, décantées et raclées dans 200  $\mu$ l de tampon de lyse TRIS-HCl. Le lysat cellulaire récupéré en microtubes (1,5 ml) est ensuite soumis au sonicateur à ultrasons afin de solubiliser les protéines. Pour terminer, les échantillons sont centrifugés (13.000 rpm; 8 min; 4 °C) et les surnageants résultants sont alors stockés à -20 °C ou les protéines directement quantifiées (voir point 3.).

#### 2.2. Extraction avec le tampon de lyse DLA

Les cellules préalablement stimulées en T25 (voir point 1.2.) sont rincées 2x au PBS froid non stérile, décantées et raclées dans 100  $\mu$ l de tampon de lyse DLA. Le lysat cellulaire récupéré en microtubes (1,5 ml) est ensuite placé sur une plaque agitatrice (30 min; 8 °C) et centrifugé (13.000 rpm ; 10 min ; 4 °C). Les surnageants résultants sont alors stockés à -20 °C ou les protéines directement quantifiées (voir point 3.).

#### 2.3. Extraction avec le tampon de lyse RIPA

Les cellules préalablement stimulées en T25 (voir point 1.2.) sont rincées 2x au PBS froid non stérile, décantées et raclées dans 200  $\mu$ l de tampon de lyse RIPA. Le lysat cellulaire récupéré en microtubes (1,5 ml) est ensuite placé sur roue (10 min; 4 °C) et centrifugé (13.000 rpm; 15 min) afin de précipiter les déchets. Les surnageants résultants sont alors stockés à -20 °C ou les protéines directement quantifiées (voir point 3.).

#### 2.4. Extraction avec le tampon de lyse HIF

Les cellules sont préalablement stimulées en T25 (voir point 1.2.). Ensuite, les milieux sont récupérés en tubes de 10 ml, centrifugés (1.500 rpm; 5 min; 4 °C) et les cellules en T25 raclées dans 200  $\mu$ l de tampon de lyse HIF. Après la centrifugation, les tubes de 10 ml sont décantés et les culots resuspendus avec les 200  $\mu$ l de lysat cellulaire. Le tout est récupéré en microtubes (1,5 ml) et centrifugé (13.000 rpm; 5 min; 4 °C) afin de précipiter les déchets. Les

	<b>Composition des produits</b>	<b>Sources</b>
Plaque 96 puits non stérile	-	Microolon® 200 greiner bio one
BSA (1 µg/µl)	-	Thermo Fisher Scientific; USA
Réactif de Pierce – Pierce® 660 nm Protein Assay	-	Thermo scientific ; USA
Eau milliQ	-	Millipore
Spectrophotomètre (660 nm)	-	BIO-RAD xMark™
Ionic Detergent Compatibility Reagent		Thermo scientific ; USA

**Tableau II.6. – Matériel utilisé pour doser les protéines par la méthode de Pierce**

<b>Immunoprécipitation</b>	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
Tampon de lyse RIPA	TRIS-HCl 50 mM pH 7,4 + NaCl 150 mM + Triton X-100 1% + SDS 0,1 % + DOC 1 %	Merck ; Allemagne
Billes IP10 Protein G plus/Protein A-Agarose	-	Merck
PBS-Azide 0,1%	PBS + Azide NaN <sub>3</sub>	Fraîchement préparé
Centrifugeuse (T°A)	-	Eppendorf Centrifuge 5702
Bleu de charge (= tampon de solubilisation) (-20°C)	TRIS-HCl 62,5 mM pH 6,8 + SDS 1% + glycérol 10 % + bleu de Bromophénol 0,03 % + DTT 0,15 %	Merck ; Allemagne
Mini-spin	-	<i>Minispin</i> Eppendorf
Vortex MS2500	-	MS2 Minishaker IKA® labo-moderne

**Tableau II.7. – Matériel et réactifs utilisés pour l'immunoprécipitation des protéines**

surnageants résultants sont alors stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou les protéines directement quantifiées (voir point 3.).

## 3. Dosage protéique

Différentes méthodes de dosage protéique ont été effectuées pour des raisons de compatibilité avec la composition des divers tampons de lyse utilisés.

### 3.1. Dosage par la méthode de Bradford

#### Matériel et réactifs

Voir Tableau II.5.

#### Méthode

Afin de doser les protéines par la méthode de Bradford, il faut disposer d'un certain nombre de tubes à essai et y ajouter 1 ml de solution de Bradford diluée 5x dans de l'eau milliQ. Ensuite, sont ajoutés de 30 s en 30 s dans les tubes correspondants:

Nbre de µl de solution à tubes à essai	(2x) le nombre d'échantillons	(2x) blanc des échantillons (= tampon de lyse)	(3x) BSA (µg/ml)			(2x) blanc de la BSA (= eau milliQ)
			1	2,5	5	
	2,5 µl	2,5 µl	1 µl	2,5 µl	5 µl	2,5 µl
	1 ml solution de Bradford diluée 5x	1 ml solution de Bradford diluée 5x	1 ml solution de Bradford diluée 5x			1 ml solution de Bradford diluée 5x

La BSA (1µg/µl) sert à construire la droite d'étalonnage qui permettra de déterminer aisément la concentration en protéine pour chaque échantillon. Après 5 min de réaction, les valeurs d'absorbance sont lues de 30 s en 30 s, à 595 nm au spectrophotomètre à l'aide d'une cuvette en Quartz.

Les concentrations protéiques (µg/µl) pour chaque échantillon sont finalement déterminées par le calcul suivant :

$\frac{\text{Moyenne échantillon} - \text{moyenne blanc (tampon de lyse)}}{\text{Moyenne BSA} - \text{moyenne blanc (eau milliQ)}} \times \frac{5}{\text{Volume échantillons}}$
---

### 3.2. Dosage par la méthode de Pierce

#### Matériel et réactifs

Voir Tableau II.6.

#### Méthode

Tout comme le dosage de Bradford, la méthode de Pierce est basée sur la construction d'une droite d'étalonnage à partir de la BSA (1µg/µl), à différentes concentrations (0 ; 1 ; 2,5 et 5 µg/µl). Le dosage de Pierce se fait en plaque 96 puits non stérile, dans lesquels sont ajoutés :

	BSA 0	BSA 1	BSA 2,5	BSA 5	Tampon de lyse	Echantillons
Eau (µl)	10	9	7,5	5	8	8
BSA (1µg/µl) (µl)	0	1	2,5	5	-	-
Echantillon (µl)	-	-	-	-	-	2
Tampon de lyse (µl)	-	-	-	-	2	-
Réactif de Pierce (µl)	150	150	150	150	150	150

Après 5 min de réaction en présence du réactif de Pierce, l'absorbance est lue au spectrophotomètre (660 nm) pour chaque puits

La méthode de Pierce dite « améliorée » repose sur le même principe qu'un dosage de Pierce classique; la Solution de Pierce est simplement supplémentée avec l'Ionic Detergent Compatibility Reagent. Ce réactif permet de doser certains échantillons présentant des problèmes de compatibilité avec le dosage de Pierce et dont le tampon de lyse comporte plus de 0,0125 % de SDS.

#### 4. Immunoprécipitation des protéines

##### Matériel et réactifs

Voir Tableau II.7.

##### Méthode

Lors de cette technique, les protéines sont préalablement extraites avec le tampon de lyse RIPA (voir point 2.3.). Ensuite, les billes (1 ml) sont lavées dans 9 ml de PBS-Azide 0,1 %, le mélange résultant homogénéisé par inversion et centrifugé (3.000 rpm; 5 min). Après avoir répété cette opération (3x), les billes sont resuspendues dans 1 ml de PBS-Azide 0,1 %. Vient l'étape de préadsorption non spécifique des protéines, où il faut ajouter 25 µl de billes pour 1 mg/ml d'échantillon, incubé sur roue (1 h; 4 °C), centrifuger (13.000 rpm; 1 min; 4 °C) et récolter les surnageants résultants. Puis vient l'étape d'immunoprécipitation proprement dite, au cours de laquelle il faut ajouter 2 à 5 µl d'anticorps, incubé sur roue (la nuit; 4 °C), ajouter 55 µl de billes, de nouveau incubé sur roue (2 h; 4 °C), centrifuger (13.000 rpm; 1 min; 4 °C) et conserver les culots résultants. Enfin, les immunoprécipités sont lavés dans 1 ml de tampon RIPA, mélangés par inversion (20x) afin de bien resuspendre les culots. Puis, il faut centrifuger les homogénats (13.000 rpm ; 1 min ; 4 °C), répéter l'opération (4x), resuspendre les culots dans 25 µl de tampon de solubilisation, vortexer 3 x 30 s et chauffer les échantillons (5 min; 95 °C). Pour terminer, les immunoprécipités sont vortexés 3 x 30 s, centrifugés (13.000 rpm; 1 min; 4 °C) et les surnageants résultants déposés sur gel acrylamide en vue d'un Western blot (voir point 5.).

#### 5. Western blot

La technique du Western blot est constituée de 3 étapes majeures; la migration des échantillons sur gel, le transfert des protéines du gel sur une membrane PVDF et la révélation des protéines. Le Western blot permet de mettre en évidence l'abondance d'une protéine d'intérêt.

	Gel de séparation ( <i>running gel</i> )			Gel d'empilement ( <i>stacking gel</i> )
	Gel 12%	Gel 10%	Gel 8%	
TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8 + SDS 0,4 %	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	-
TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8 + SDS 0,4 %	-	-	-	1,875 ml
Acrylamide 30 % (Bis 0,8%) (4 °C)	6 ml	5 ml	4 ml	0,75 ml
Eau milliQ	4,5 ml	5,5 ml	6,5 ml	4,125 ml
Temed (T°A)	15 µl	15 µl	15 µl	7,5 µl
Ammonium persulfate (APS) (T°A) (solubilisée dans de l'eau milliQ)	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml

**Tableau II.8. – Matériel et réactifs utilisés pour la préparation des gels de séparation et d'empilement requis pour la migration des protéines sur gel polyacrylamide SDS-PAGE**

	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
Gel de séparation	Voir Tableau II.8.	Fraîchement préparé
Gel d'empilement	Voir Tableau II.8.	Fraîchement préparé
Temed	-	Amersham Biosciences
APS	Voir Table 2.8.	GE HealthCare ; SuèdeAC
Tampon d'électrophorèse (4 °C)	TRIS-HCl 25 mM + glycine 192 mM + SDS 0,1 % pH 8,6 porter à volume avec de l'eau milliQ	Fraîchement préparé Merck ; Allemagne
Microtubes (1,5 ml)	-	SARSTEDT ; Allemagne
Vortex MS2500	-	MS2 Minishaker IKA® labo-moderne
Mini-spin	-	<i>Minispin</i> Eppendorf
Générateur – Electrophoresis Power Supply	-	Amersham pharmacia biotech
Butanol	-	
Cuve et support pour électrophorèse	-	
Plaques de verre	-	
Bleu de charge (= tampon de solubilisation) (-20 °C)	TRIS-HCl 62,5 mM pH 6,8 + SDS 1% + glycérol 10 % + bleu de Bromophénol 0,03% + DTT 0,15%	Merck ; Allemagne
Eau milliQ	-	Millipore
Etalon de poids moléculaire SeeBlue® Plus Prestained Standard (1x) (4 °C)	-	Invitrogen

**Tableau II.9. – Matériel et réactifs utilisés pour la migration des protéines sur gel polyacrylamide SDS-PAGE**

	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
Membrane polyvinylidène difluoride (PVDF)	-	Millipore
Méthanol	-	ACROS ORGANICS ; Royaume-Uni
Tampon de transfert	TRIS-HCl 20 mM + glycine 145 mM + Méthanol pH 8,3 porter à volume avec de l'eau milliQ	Merck ; Allemagne
Eponges	-	
Blotteur semi-dry transfer unit	-	Hoefer SemiPhor
Générateur – Electrophoresis Power Supply	-	Amersham pharmacia biotech

**Tableau II.10. – Matériel et réactifs utilisés pour le transfert des protéines sur membrane PVDF**

	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
TBS (10x)	TRIS-HCl 20 mM pH 7,6 + NaCl 137 mM porter à volume avec de l'eau milliQ	Fraîchement préparé Merck ; Allemagne
TBS-t (tampon salin ne dénaturant pas les anticorps)	TBS (10x) + Tween® 20 (0,1 %) (pour éviter l'agrégation des anticorps)	Fraîchement préparé Merck ; Allemagne
Lait 2% (agent bloquant)	-	Amersham
Anticorps primaire et secondaire	Voir Tableau II.12.	Voir Tableau II.12.
Plaque de verre	-	
Solutions de révélation A et B	-	Lumigen™ ; GE HealthCare ; Royaume-Uni
ImageQuant 350	-	GE Healthcare Life Sciences

**Tableau II.11. – Matériel et réactifs utilisés pour la révélation des protéines avec le système ECL Advance (système HRP)**

<b>Anticorps primaire</b>	<b>Dilution</b>	<b>Espèce</b>	<b>Incubation</b>	<b>Sources</b>
Anti 3-nitrotyrosine (3-NT)	1/1000	Lapin	O/N ; 4 °C	Millipore
Anti BiP/Grp78	1/5000	Souris	2 h ; T°A	BD Biosciences Pharmingen
Anti CHOP/ GADD153 (F-168) : sc-575	1/1000	Lapin	O/N ; 4 °C	Santa Cruz Biotechnology, inc
Anti Grp94 SPA-850	1/5000	Rat	2 h : T°A	Stressgen biotechnologies
Anti HIF-1 $\alpha$	1/100	Souris	2 h ; T°A	BD Biosciences Pharmingen
Anti Nrf2	1/100	Lapin	O/N ; 4 °C	Santa Cruz Biotechnology, inc
<b>Anticorps secondaire</b>				
Alexa 488 (espèce)	1/1000	-	1 h ; T°A	
HRP anti IgG (espèce)	1/300 000	-	30-60 min ; T°A	Amersham Biosciences
<b>Contrôle de charge</b>				
Anti $\alpha$ -tubuline	1/50 000	Souris	30 min ; T°A	Sigma

**Tableau II.12. – Liste des anticorps et des dilutions utilisées**



### 5.1 Migration des échantillons

#### Matériel et réactifs

Voir Tableaux II.8. et II.9.

#### Méthode

Les gels de séparation et d'empilement sont préparés, en ajoutant le Temed et l'APS au dernier moment, car ces 2 réactifs entraînent la polymérisation de ces gels. Le gel de séparation est ensuite coulé entre 2 plaques en verre, lesquelles sont placées dans une cuve et calées dans un support adéquat. Puis une fine couche de butanol est déposée au-dessus du gel afin d'éviter le contact avec l'air et ainsi permettre sa polymérisation (45 min). La surface du gel de séparation est alors rincée à l'eau distillée et le gel d'empilement est déposé au-dessus du gel de séparation, après y avoir délicatement glissé le peigne qui délimitera les puits. Pendant ce temps, les échantillons sont préparés dans du bleu de charge et dilués dans de l'eau milliQ, de sorte à obtenir une concentration optimale en protéines, généralement comprise entre 15 et 20 µg. Les échantillons sont alors vortexés, centrifugés, bouillis (5 min ; 100 °C) et de nouveau centrifugés. Après 20 min de polymérisation du gel d'empilement, le peigne est retiré et les échantillons sont chargés sur le gel (20-25 µl). Un des puits du gel est réservé à l'étalon SeeBlue Plus (7 µl), lequel sert d'indicateur de poids moléculaire. Le compartiment extérieur de la cuve est alors rempli de tampon d'électrophorèse et la cuve est reliée à un générateur (200 V ; 110 mA ; 15 Watt/gel) pour permettre la migration des protéines.

### 5.2. Transfert

#### Matériel et réactifs

Voir Tableau II.10.

#### Méthode

Après environ 1 h de migration, vient l'étape de transfert des protéines du gel sur une membrane de PVDF, préalablement activée dans du méthanol (1 min) puis trempée dans du tampon de transfert (5-15 min). Le gel est tout d'abord retiré de la cuve et débarrassé de son gel d'empilement et du front de migration (bleu). Vient la préparation du « sandwich » placé au niveau d'un blotteur et constitué des couches suivantes, préalablement imbibées de tampon de transfert (de bas en haut) : une 1<sup>ère</sup> éponge, 2 Whatmann, la membrane activée, le gel, 2 Whatmann et une 2<sup>e</sup> éponge. Le blotteur est alors relié à un courant électrique (600 V ; 400 mA ; 30 Watt/gel) et le transfert est lancé, durant environ 2 h. A titre d'information, le nombre de mA est défini par les dimensions de la membrane (L x l).

### 5.3. Révélation des protéines avec le système ECL Advance (système HRP)

#### Matériel et réactifs

Voir Tableaux II.11. et II.12.

	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
PBS non stérile (4 °C)	Tampon phosphate + NaCl pH 7,4 porter à volume avec de l'eau milliQ	Fraîchement préparé Merck ; Allemagne
PBS-BSA 2 % (4 °C)	PBS non stérile + BSA (poudre)	Fraîchement préparé
PBS-Triton X-100 1 % (4 °C)	PBS non stérile + Triton X-100	Fraîchement préparé
PFA 4 % diluée en PBS (-20 °C)	-	
Anticorps primaire 1 :100	Voir Tableau II.12.	Voir Tableau II.12.
Anticorps secondaire 1 :1000	Anticorps secondaire de souris anti-IgG lapin couplé à un Alexa 488 nm (vert)	Molecular Probes ; USA
ToPro (-20 °C)	Aliquots de ToPro dilués dans une solution de RNase 2 mg/ml en PBS	Molecular probes ; Pays-Bas
Boîte de Petri en verre + parafilm	-	
Mowiol préchauffé	-	Molecular Probes ; USA
Lamelles couvre-objets	-	
Lames porte-objets SuperFrost Microscope Slides	-	VWR

**Tableau II.13. – Matériel et réactifs utilisés pour réaliser un marquage immunocytochimique (immunofluorescence)**

### Méthode

Après les 2 h de transfert, la membrane est récupérée et placée à agiter dans un Falcon ou une boîte appropriée, en présence de TBS-t. Vient l'étape du « blocking » dans du TBS-t + lait (2 h ; T°A). La membrane comportant les protéines transférées est alors mise à incuber (2 h ; T°A ou la nuit; 4 °C) en présence de l'anticorps primaire préalablement dilué dans du TBS-t + lait. Ensuite, la membrane est rincée 4 x 5 min dans du TBS-t pour ôter l'excès d'anticorps primaire. La membrane est alors mise à incuber (30-60 min ; T°A) en présence de l'anticorps secondaire couplé à la HRP, préalablement dilué dans du TBS-t + lait. Après un dernier rinçage 4 x 5 min dans du TBS-t pour enlever l'excès d'anticorps secondaire, la membrane est mise en présence du mélange de révélation (1 ml de solution A + 1 ml de solution B) sur une plaque de verre. Après 5 min d'incubation, la membrane est placée entre 2 films transparents pour éviter qu'elle ne sèche et révélée à l'aide de l'Imagequant350.

### **6. Marquage immunocytochimique ou Immunofluorescence**

#### Matériel et réactifs

Voir Tableau II.13.

#### Méthodes

##### 6.1. Marquage après fixation avec du PFA

Tout d'abord, les solutions de PBS, PBS-BSA 2 %, PBS-Triton et PFA 4 % sont préparées fraîchement, près de 30 min à l'avance. Ensuite, les cellules préalablement stimulées en plaque 24 puits (voir point 1.2) sont rincées 1x au PBS non stérile (1 ml). Après avoir décanté les puits à l'aide de la poire en plastique, les cellules sont fixées avec 500 µl de PFA 4 % (10 min ; sur glace). Ensuite, les cellules sont perméabilisées avec 1 ml de PBS-Triton 1 % (5 min ; T°A) puis rincées 3 x 10 min avec 1 ml de PBS-BSA 2 % afin de bloquer les sites aspécifiques. La chambre humide est alors préparée en couvrant le fond d'une boîte de Pétri en verre avec du papier Whatmann humidifié à l'eau milliQ, sur lequel sont disposées 2-3 bandes de parafilm (hydrophobe). L'anticorps primaire est alors centrifugé et dilué 1 :100 (1 µl d'anticorps dans 100 µl de PBS-BSA 2 %). Chaque lamelle est alors égouttée et retournée (les cellules étant en surface) au niveau des bandes de parafilm de la chambre humide, sur lesquelles auront préalablement été déposés 30 µl d'anticorps dilué/lamelle (ou 30 µl de PBS-BSA 2 % pour la condition « CTL anticorps secondaire »). La boîte de Pétri est alors scellée avec du parafilm et incubée en présence de l'anticorps primaire (2 h; T°A ou la nuit; 4 °C). Après avoir décanté les puits et ajouté 1 ml de PBS-BSA 2 %/puits, les cellules sont égouttées, retournées et transférées au niveau de la plaque 24 puits. Les cellules sont rincées 3 x 10 min avec 1 ml de PBS-BSA 2 % et l'anticorps secondaire centrifugé et placé sur glace. Les étapes suivantes se déroulent à l'obscurité (à l'aide d'une feuille d'aluminium) afin de préserver le fluorochrome. Les cellules sont alors égouttées et retransférées dans une nouvelle chambre humide et incubées (1 h ; T°A) en présence de 30 µl d'anticorps secondaire/lamelle, dilué 1 :1000 (1 µl d'anticorps dans 1000 µl de PBS-BSA 2%) (ou 30 µl de PBS-BSA 2 % pour la condition « CTL anticorps primaire »). Après avoir décanté les puits et ajouté 1 ml de PBS-BSA 2 %/puits, les cellules sont égouttées, retournées et transférées au niveau de la plaque 24 puits. Les cellules sont rincées 3 x 10 min avec 1 ml de PBS-BSA 2 % puis 1 x avec 1 ml de PBS seul.

	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
Sonde HPF (5 mM)	-	Bachem
Sonde H <sub>2</sub> DCFDA (50 mM)	-	Sigma Aldrich
HBSS (4°C)	0,137 M NaCl + 5,36 mM KCl + 440 nM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 5 mM glucose + 299 nM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O + 4,2 mM NaHCO <sub>3</sub>	Fraîchement préparé Merck ; Allemagne
HBSS complet (T°A)	HBSS + 0,16 M MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O + 0,24 M CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O pH 7,35	Fraîchement préparé
SIN-1 (CTL positif)	Voir Tableau II.3.	Invitrogen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (CTL positif) (hydrogen peroxide 30 %)		Merck
Fluorimètre Fluoroskan Ascent	-	Thermo Scientific

**Tableau II.14. – Matériel et réactifs utilisés pour détecter la génération de peroxynitrite ou de ROS**

Le marquage des noyaux se fait en égouttant et en retournant les lamelles dans une nouvelle chambre humide et en présence de 30 µl de ToPro dilué/lamelle (35 min ; T°A) (10 µl de ToPro dilué dans 800 µl d'une solution de RNase 2mg/ml en PBS). La RNase va digérer l'ARN et permettre ainsi au Topro de se fixer uniquement à l'ADN. Après marquage des noyaux, les cellules sont égouttées, retournées et transférées au niveau de la plaque 24 puits pour un rinçage 3 x au PBS seul. Enfin, le montage sur lames porte-objet est réalisé en déposant 2 gouttes de Mowiol préchauffé (à 56 °C)/lame porte-objet (2 lamelles/porte-objet) et chaque lamelle y est retournée délicatement. On laisse durcir au moins une nuit à 4 °C avant de regarder au microscope confocal (Leica SP5).

### 6.2. Marquage après fixation avec le mélange Méthanol-Acétone

Les cellules sont fixées avec 500 µl de Méthanol-Acétone (5 min ; sur glace) et rincées 3x avec 1 ml de PBS seul puis 3 x 10 min avec 1 ml de PBS-BSA 2%. Les étapes ultérieures suivent le même procédé que pour le marquage après fixation avec du PFA (voir point 6.1.).

### 6.3. Marquage après fixation avec le mélange Ethanol-Acide acétique

Les cellules sont fixées avec 500 µl d'Ethanol-Acide acétique (6 min ; sur glace) et rincées 3x avec 1 ml de PBS seul puis 3 x 10 min avec 1 ml de PBS-BSA 2%. Les étapes ultérieures suivent le même procédé que pour le marquage après fixation avec du PFA (voir point 6.1.).

## **7. Détection de la génération de peroxynitrite et d'un stress oxydatif avec les sondes HPF et H<sub>2</sub>DCFDA**

### Matériel et réactifs

Voir Tableau II.14.

### Méthode

La sonde fluorescente HPF est utilisée pour détecter du peroxynitrite. Les cellules sont repiquées en plaque 24 puits (voir point 1.1.) et incubées (30-45 min) à 37 °C (environnement 5 % de CO<sub>2</sub>), en présence de la sonde HPF préalablement diluée dans de l'HBSS complet, dans l'obscurité. Après incorporation de la sonde HPF, les cellules sont rincées 1x à l'HBSS complet et stimulées (voir point 1.2.). La fluorescence résultante correspond à la formation de peroxynitrite et est mesurée au fluorimètre ( $\lambda_{Em}$  485 nm ;  $\lambda_{Exc}$  520 nm).

Quant à la sonde H<sub>2</sub>DCFDA, elle est utilisée pour détecter une production de dérivés actifs ROS. Les cellules sont repiquées en plaque 24 puits (voir point 1.1.) et incubées (30-45 min) à 37 °C (avec 5 % de CO<sub>2</sub>), en présence de la sonde H<sub>2</sub>DCFDA préalablement diluée dans de l'HBSS, dans l'obscurité. Après incorporation de la sonde H<sub>2</sub>DCFDA, les cellules sont rincées 1x à l'HBSS et stimulées (voir point 1.2.). La fluorescence résultante correspond à la production de ROS et est mesurée au fluorimètre ( $\lambda_{Em}$  485 nm ;  $\lambda_{Exc}$  520 nm).

L'hypoxie-réoxygénation est connue dans la littérature pour induire la production par les cellules endothéliales de peroxynitrite, de manière plus physiologique (Zou and Bachschmid 1999) et a donc également été testée. Les cellules sont repiquées en plaque 24 puits (voir point 1.1.) et incubées (30-45 min), en présence de la sonde HPF ou H<sub>2</sub>DCFDA

<b>Extraction d'ARN Kit TRI Reagent</b>	<b>Composition des produits/solutions</b>	<b>Sources</b>
TRI Reagent Solution (4°C) (tampon de lyse)	-	Ambion®
Racloirs stériles non pyrogéniques	-	SPL Life Sciences
Microtubes (1,5 ml)	-	SARSTEDT ; Allemagne
Chloroforme RNase free	-	
Isopropanol RNase free	-	
Centrifugeuse (4°C)	-	Eppendorf centrifuge 5415R
Ethanol RNase free froid 75 %	-	
Vortex MS2500	-	MS2 Minishaker IKA® labo- moderne
Centrifugeuse (T°A)	-	Eppendorf Centrifuge 5702
Eau milliQ	-	Millipore
<b>Extraction d'ARN Kit QIAgen®</b>	<b>Composition des produits</b>	<b>Sources</b>
PBS froid RNase free	-	Lonza BioWhittaker
Buffer RLT (tampon de lyse)	-	QIAgen®
Tips noirs spéciaux	-	QIAgen®
Reagent Rack Bottle	Ethanol 70% + Buffer RW1 + Buffer RPE + eau RNase free	QIAgen® QIAgen® QIAgen®
Microtubes (2 ml)	-	QIAgen®
Microtubes (1,5 ml)	-	QIAgen®
Adaptateurs	-	QIAgen®
RNeasy mini-spin column	-	Kit QIAgen®
Appareil QIAcube®	-	QIAgen ®

**Tableau II.15. – Matériel utilisé pour extraire de l'ARN**

<b>Dosage de l'ARN</b>	<b>Composition des produits</b>	<b>Sources</b>
NanoDrop® Spectrophotometer ND-100	-	Isogen Life Sciences
Eau milliQ (RNase free)	-	Millipore

**Tableau II.16. – Matériel utilisé pour doser l'ARN au NanoDrop®**

préalablement diluée, dans l'obscurité. Après incorporation de la sonde, les cellules sont rincées, stimulées (voir point 1.2.) puis soumises à une hypoxie de 20 à 30 min, suivie d'une réoxygénation de 5 à 10 min. L'hypoxie est obtenue en réduisant l'atmosphère de 95 % d'O<sub>2</sub> et 5 % de CO<sub>2</sub> à une atmosphère de 95 % de N<sub>2</sub> et 5 % de CO<sub>2</sub>. Quant à la réoxygénation, elle est obtenue en restaurant une atmosphère de 95 % d'O<sub>2</sub> et 5 % de CO<sub>2</sub>. Des conditions normoxiques sont également réalisées en tant que contrôle. La fluorescence résultante correspond à la production de peroxy-nitrite (HPF) ou de ROS (H<sub>2</sub>DCFDA) et est mesurée au fluorimètre ( $\lambda_{Em}$  485 nm ;  $\lambda_{Exc}$  520 nm).

### 8. Extraction d'ARN

#### 8.1. Protocole d'extraction avec le TRI-Reagent

##### Matériel

Voir Tableau II.15.

##### Méthode

Tout d'abord, il faut bien décanter les T25 afin d'éviter toute trace de milieu. Les cellules sont ensuite raclées dans 1.000 µl de TRI Reagent Solution. Le lysat cellulaire résultant est récupéré en microtubes (1,5 ml), suivi d'une incubation (5 min ; T°A). Puis, 200 µl de chloroforme RNase free sont ajoutés dans chaque microtube (1,5 ml), lesquels sont alors agités pendant 15 s, afin de bien les homogénéiser. Après incubation (5-15 min ; T°A), les microtubes (1,5 ml) sont centrifugés (12.000 g ; 15 min ; 4 °C) pour séparer les phases. Il en résulte une phase supérieure (claire) contenant l'ARN, une interface protéique (blanchâtre) et un culot de déchets (rose). Après avoir prélevé et retransféré environ 500 µl de la phase supérieure dans des microtubes (1,5 ml), 600 µl d'isopropanol RNase free sont ajoutés et quelques inversions sont requises pour de nouveau bien homogénéiser l'extrait. Une nouvelle incubation (10 min ; T°A) est suivie par une étape de centrifugation (12.000 g ; 10 min ; 4 °C). Ensuite, il faut décanter les T25 à fond afin d'éliminer un maximum d'isopropanol et ainsi éviter un maximum de contaminations en sels. Après avoir resuspendu le culot dans 1000 µl d'éthanol RNase free 75 % froid, les microtubes (1,5 ml) sont soumis à un léger coup de vortex et à une centrifugation (7.600 g ; 5 min ; T°A). Il faut ensuite décanter prudemment et laisser sécher le culot (10 min ; T°A). Enfin, l'extraction d'ARN se termine en resuspendant le culot dans 20 µl d'eau RNase free et en chauffant les microtubes (1,5 ml) (10 min ; 55 °C) afin de solubiliser l'ARN. Les échantillons sont alors conservés à -70 °C ou directement dosés au NanoDrop® (voir point 9.) en vue d'une RT (voir point 10.).

#### 8.2. Protocole d'extraction au QIAcube®

##### Matériel

Voir Tableau II.15.

<b>Reverse Transcription</b>	<b>Composition des produits</b>	<b>Sources</b>
Eau milliQ (RNase free)	-	Millipore
Microtubes (1,5 ml)	-	SARSTEDT ; Allemagne
Vortex MS2500	-	MS2 Minishaker IKA® labo-moderne
Mini-spin	-	<i>Minispin</i> Eppendorf
Tubes PCR	-	SARSTEDT ; Allemagne
<b>Kit Roche (-20°C)</b>	<b>Composition des produits</b>	<b>Sources</b>
Anchored oligo(dT)18 primer (50 pmol/μl)	-	Roche
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5x)	-	Roche
Protector RNase Inhibitor (40 U/μl)	-	Roche
Deoxynucleotide Mix (10 mM)	-	Roche
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μl)	-	Roche
<b>Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (-20°C)</b>	<b>Composition des produits</b>	<b>Sources</b>
RT buffer (10x)	-	Applied Biosystems
Random Primers (10x)	-	Applied Biosystems
dNTP mix (25x)	-	Applied Biosystems
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/μl)	-	Applied Biosystems
RNase Inhibitor	-	Applied Biosystems
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	-	MJ Research

**Tableau II.17. – Matériel utilisé pour rétrotranscrire l'ARN en ADNc**



### Méthode

Les échantillons sont préparés à l'aide du kit QIAgen®. Les T25 contenant les cellules préalablement stimulées (voir point II.1.2.) sont d'abord décantées à la pipette Pasteur. Puis les cellules sont rincées 1x avec 5 ml de PBS froid non stérile et RNase free. Après avoir décanté à fond les T25, les cellules sont raclées dans 350 µl de buffer RLT du kit QIAgen®. Le lysat cellulaire résultant est récupéré en microtubes de 2 ml et conservé à -70 °C ou directement analysé au QIAcube®.

Avant d'extraire l'ARN, le QIAcube® nécessite quelques préparations. Il faut disposer d'autant d'adaptateurs que d'échantillons. Dans chacun de ces adaptateurs, sont placés un microtube (1,5 ml) pour collecter l'ARN extrait et une RNeasy mini spin column. Les adaptateurs sont alors placés au niveau du rotor, suivant une disposition particulière (voir fiche technique du QIAcube®). Il faut également disposer des tips noirs appropriés et le Reagent Rack Bottle. Celui-ci comporte des réservoirs d'éthanol 70 %, de Buffer RW1, de Buffer RPE et de l'eau RNase free, fournis dans le kit QIAgen®. Après avoir placé les échantillons dans l'appareil et ôté les bouchons des réservoirs du Reagent Rack Bottle, le QIAcube® est lancé. Après environ 30 min, l'extraction d'ARN est terminée et les microtubes collecteurs (1,5 ml) contenant l'ARN sont conservés à -70 °C ou bien directement utilisés pour faire la RT (voir point II.10.).

### **9. Dosage de l'ARN au NanoDrop®**

#### Matériel

Voir Tableau II.16.

#### Méthode

Les extraits d'ARN (voir point II.8.) sont vortexés, spinnés et placés sur glace. Ensuite, 1 µl d'eau RNase free permet de calibrer le NanoDrop® puis de nouveau 1 µl d'eau RNase free est placé au niveau de l'appareil, constituant le blanc des échantillons. Puis, 1 µl de chaque échantillon est successivement déposé dans l'appareil et l'ARN quantifié. Entre chaque dosage d'ARN, le NanoDrop® est rincé à l'eau RNase free.

### **10. Reverse Transcription ou Rétrotranscription (RT)**

#### Matériel

Voir Tableau II.17.

#### **10.1. RT pour analyse en Real-time RT-PCR (qRT-PCR)**

#### Méthode

Avant de réaliser la RT, des calculs de dilutions des échantillons d'ARN sont requis. Il suffit de convertir les valeurs obtenues après dosage d'ARN (ng/µl) en µg d'ARN/µl puis de diviser le nombre de µg d'ARN voulu (compris entre 0,5 et 2 µg d'ARN) par le nombre de µg d'ARN obtenu. Ensuite, on porte à un volume final de 12 µl, avec de l'eau milliQ RNase free dans des microtubes (1,5 ml). Après dilution, les échantillons résultants sont alors vortexés, centrifugés, puis placés sur glace. Par la suite, 1 µg d'oligo dT est ajouté à chaque microtube

<b>Real-time RT-PCR</b>	<b>Composition des produits</b>	<b>Sources</b>
Eau milliQ (RNase free)	-	Millipore
Tips spéciaux	-	Sorenson Bioscience
Microtubes (1,5 ml)	-	SARSTEDT ; Allemagne
Amorces sens et antisens (9 µM) à diluer 3x (3 µM)	-	Voir Tableau II.19.
Power SyBR®Green PCR Master Mix	-	Applied Biosystems ; Royaume-Uni
Vortex MS2500	-	MS2 Minishaker IKA® labo-moderne
Mini-spin	-	<i>Minispin</i> Eppendorf
Plaque 96 puits stérile	-	MicroAmp™ Applied Biosystems ; Singapour
Film PCR compatible RNase free (pour sceller la plaque)	-	MicroAmp™ Applied Biosystems ; USA
Centrifugeuse centra CL3R	-	ThermoIEC
Appareil Real-time PCR 7900HT	-	Applied Biosystems ; Belgique
<b>Cartes microfluidiques</b>	<b>Composition des produits</b>	<b>Sources</b>
Eau milliQ (RNase free)	-	Millipore
Tips spéciaux	-	Sorenson Bioscience
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	-	Applied Biosystems ; USA
Mini-spin (pour tubes PCR)	-	FisherBrand®
Plaque 384 puits stérile TLDA	-	Applied Biosystems ; USA
Centrifugeuse Multifuge 3 S-R (pour carte microfluidique)	-	Heraeus
« Outil pour sceller la plaque »	-	Applied Biosystems ; USA
Appareil Real-time PCR 7900HT	-	Applied Biosystems ; Belgique

**Tableau II.18. – Matériel utilisé pour l'analyse de l'expression en ARNm par Real-time RT-PCR ou cartes microfluidiques**

Gènes	Amorce F	Amorce R
23 KDa	GCCTACAAGAAAGTTTGCCTA TCTG	TGAGCTGTTTCTTCTTCCGG TAGG
HO-1	GCAGTCAGGCAGAGGGTGAT A	CAACTCCTCAAAGAGCTGG ATGTT
CHOP	GCAAGAGGTCCTGTCTTCAGA TG	CTCAGTCAGCCAAGCCAGA GA
MCP-1	CATTGTGGCCAAGGAGATCTG	AGTGAGTGTTCAAGTCTTCG GAGTT

**Tableau II.19. – Liste des amorces utilisées en Real-time RT-PCR**

Transfection	Composition des produits	Sources
DHG-L1 (4°C)	DMEM (réf. 51200)	Gibco ; Royaume-Uni
siRNA négatifs (NT1, RF et/ou NT SmartPool) (-20 °C)	-	ThermoScientific
siRNA test (-20 °C)	-	ThermoScientific
SDS 1 % (T°A)	-	Merck
Mini-spin	-	<i>Minispin</i> Eppendorf
INTERFERin <sup>TM</sup> (4 °C) (agent de transfection)	-	Polyplus transfection <sup>TM</sup>
Tubes de 10 ml	-	

**Tableau II.20. – Matériel utilisé pour transfecter des cellules endothéliales EAhy926**

(1,5 ml) et les échantillons sont mis à incuber (10 min ; 65 °C). Après incubation, les échantillons sont centrifugés et placés sur glace (5 min). Vient la préparation du Mix pour chacun des échantillons ; dans un microtube (1,5 ml), sont ajoutés 4 µl de Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5 µl de Protector RNase Inhibitor, 2 µl de Deoxynucleotide Mix et 0,5 µl de Anchored-oligo(dT) 18 primer. Le Mix est alors délicatement mélangé et centrifugé (et non vortexé, à cause des amorces) et 7 µl de Mix/échantillon sont ajoutés aux microtubes (1,5 ml). Après avoir homogénéisé et centrifugé les échantillons, ceux-ci sont mis à incuber (30 min ; 55 °C). Enfin, les échantillons sont centrifugés, mis à incuber (5 min ; 85 °C) et les ADNc résultants sont finalement congelés à -20 °C ou directement soumis à l'analyse en Real-time RT qPCR (voir point 11.1).

### 10.2. RT pour analyse en carte microfluidique

#### Méthode

Après avoir réalisé les calculs de dilution des échantillons d'ARN (concentration finale de 2 µg d'ARN) tel que décrit au point 10.1., on porte à un volume final de 10 µl, avec de l'eau milliQ Rnase free, dans des tubes PCR. Ensuite, 10 µl de Master Mix sont ajoutés dans chaque tube PCR, à raison de 2 µl de RT buffer, 0,8 µl de dNTP mix, 2 µl de Random Primers, 1 µl de MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µl de RNase Inhibitor et 3,2 µl d'eau milliQ RNase free par tube PCR. Ceux-ci sont alors homogénéisés et centrifugés. Les échantillons sont finalement placés dans le Thermocycler et la RT est lancée suivant un programme préalablement défini. Lors de cette RT, les échantillons sont soumis à 4 cycles de température de 25 °C (étape 1), 37 °C (étape 2), 85 °C (étape 3) et 4 °C (étape 4). Les échantillons d'ADNc sont alors congelés à -20 °C ou directement soumis à l'analyse en carte microfluidique (voir point 11.2.).

## 11. Analyse de l'abondance des ARNm

### 11.1. Real-time RT -PCR (ou qRT-PCR)

#### Matériel

Voir Tableaux II.18. et II.19.

#### Méthode

En premier lieu, les échantillons d'ADNc et amorces F et R de chaque gène étudié sont dégelés et placés sur glace. Les ADNc sont habituellement dilués 100x dans de l'eau RNase free et les amorces (9 µM) diluées 3x (3 µM) dans de l'eau RNase free. Ensuite, vient la préparation du Master Mix pour chaque gène étudié ; ce Master Mix comporte le SyBRGreen, les amorces F et R diluées ainsi que de l'eau RNase free. Il est important de bien vortexer et/ou de centrifuger les solutions entre chaque dilution, afin de bien les homogénéiser (pas de vortex en présence d'amorces). Après avoir effectué ces dilutions, 20 µl de Master Mix, supplémenté avec 5 µl d'ADNc (tests) ou avec 5 µl d'eau RNase free (blancs) sont ajoutés, dans chacun des puits de la plaque Real-time qPCR 96 puits stérile, en fonction du gène étudié. Parmi les gènes étudiés figure le HKG (housekeeping gene), lequel représente un gène de normalisation, servant de référence pour l'analyse ultérieure des gènes d'intérêt et dont l'expression doit être stable pour les différentes conditions. Après avoir scellé la plaque 96 puits, celle-ci est centrifugée (30 s ; 600 rpm). Enfin, l'analyse en qPCR est lancée.

Le graphe issu de l'analyse en qPCR illustre l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles de la PCR, ce qui donne les valeurs de Ct. Les résultats fournissent donc des valeurs de Ct et leur moyenne entre 2 conditions données (doubles), ainsi que les courbes d'amplification et de dissociation, laquelle illustre le désappariement des 2 brins. Quant à la courbe d'amplification, elle permet de voir si l'expression a varié ou si elle est restée relativement stable (cas du HKG), suivant que les courbes tendent à s'éloigner ou à se rapprocher les unes des autres, respectivement.

En fait, l'appareil Real-time va augmenter la température jusqu'à ce que ce désappariement ait lieu, ce qui se traduit par une chute de l'intensité de fluorescence car le SyBRGreen n'est plus capable de s'intercaler entre les 2 brins et donc, cesse d'émettre de la fluorescence. Cette augmentation de température dépend de la longueur de l'amplicon, de la quantité en bases GC,... Les valeurs de Ct correspondent à la valeur du cycle de PCR à laquelle l'intensité de fluorescence va diminuer. Après avoir déterminé le  $\Delta Ct$  ( $Ct$  gène d'intérêt –  $Ct$  du HKG) et le  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  gène condition testée -  $\Delta Ct$  condition contrôle), le Fold d'induction (Fi) est déterminé ( $Fi = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) et détermine le niveau d'expression en ARNm pour chaque condition testée, rapportée au contrôle.

### 11.2. Carte microfluidique

#### Matériel

Voir Tableaux II.18 et II.19.

#### Méthode

Un design de carte microfluidique a été réalisé au laboratoire en vue de quantifier l'abondance de 96 ARNm, pertinents par rapport à la physiologie de la cellule endothéliale. Ces cartes microfluidiques correspondent à des plaques 384 puits reliés à 8 pistes au total et permettent de comparer des profils d'expression en ARNm de jusqu'à 4 échantillons différents. Par ailleurs, l'agent intercalant utilisé est le TaqMan.

Lors de l'analyse par carte microfluidique, les échantillons d'ADNc sont dégelés et placés sur glace. Après les avoir centrifugés, il faut préparer le PCR Master Mix, à raison de 100  $\mu l$  de volume final par échantillon. Ce PCR Master Mix est constitué de 2  $\mu l$  d'ADNc préalablement dilué dans 98  $\mu l$  d'eau milliQ RNase free et 100  $\mu l$  de TaqMan (volume valable pour 2 pistes). Une fois le PCR Master Mix préparé et centrifugé, il faut charger 100  $\mu l$  de ce mix par piste (en inclinant légèrement la carte) et la plaque est alors centrifugée 2-3x (1.200 rpm ; 1 min). Après avoir scellé et placé la plaque dans l'appareil Real-time, l'analyse pour carte microfluidique est lancée.

### 12. Transfection des cellules avec des siRNA

#### Matériel

Voir Tableau II.20.

#### Méthode

Les cellules sont repiquées en T25 (voir point 1.1.) le jour même. Lorsqu'elles sont bien adhérentes, elles sont rincées 1x avec 3-4 ml de DHG-L1 ou de PBS stérile. Ensuite, les T25 sont décantées à fond et un volume de 4,5 ml ou 5 ml de DHG-L1 est ajouté dans les T25 en présence des siRNAs ou dans les T25 contrôles, respectivement. Après avoir passé la hotte et tout le matériel au SDS 1 %, les siRNAs (spécifique, Non-Targetting (NT), RISC Free (RF) et/ou NT SmartPool) sont centrifugés et mis sur glace. Le siRNA NT sert de CTL négatif, ne possédant pas d'ARNm cible, tout comme le siRNA RF qui ne sera pas reconnu par le complexe RISC intervenant dans la machinerie des ARN interférents. Quant au siRNA NT SmartPool, celui-ci représente un mélange de plusieurs siRNAs NT différents. Puis, il faut prévoir un tube de 10 ml pour chaque condition (spécifique, NT et RF) dans lequel est ajouté un volume de DHG seul, de siRNA et d'INTERFERin<sup>TM</sup>, l'agent de transfection. Ces tubes de 10 ml sont alors vortexés et mis à incuber (10 min), pour permettre la formation des complexes. Après avoir ajouté 500 µl de chaque complexe dans les T25 correspondantes, les cellules ainsi transfectées sont mises au repos en étuve, à 37 °C (environnement 5 % de CO<sub>2</sub>).

# III. RESULTATS ET DISCUSSION

### III. RESULTATS ET DISCUSSION

Lors de ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux effets du peroxy-nitrite sur des cellules endothéliales en culture. Nous avons choisi de travailler sur des HUVECs et/ou des cellules EAhy926. Les HUVECs sont des cellules en primo-culture, rendant leur manipulation et leur entretien peu aisés. En effet, leur nombre de passages en culture est limité : au-delà de 10 passages en culture, les HUVECs se différencient, cessent de proliférer et finissent par mourir (Bouis, Hospers et al. 2001). De plus, de part leur origine hétérogène, les HUVECs peuvent répondre différemment d'un lot à l'autre, rendant les études difficilement comparables et reproductibles entre elles. C'est pourquoi nous avons eu également recours à des cellules hybrides, telles les cellules EAhy926. Il s'agit de cellules immortelles, issues de la fusion entre la lignée A549, issue de carcinome pulmonaire et des HUVECs. De manière générale, des cellules immortelles, sont utilisées pour favoriser la standardisation et la reproductibilité des résultats. En effet, la culture de cellules EAhy926, caractérisée par une croissance rapide est relativement aisée, contrairement aux HUVECs, et peut atteindre un grand nombre de passages en culture (Emeis and Edgell 1988). Cependant, de telles souches cellulaires ne reproduisent pas exactement toutes les fonctions des cellules en primo-culture. L'idéal est donc de disposer de cellules immortelles présentant le plus de similitudes possibles avec des cellules en primo-culture. Différentes souches cellulaires sont caractérisées, telles les BAECs et les HAECs. Par ailleurs, les cellules EAhy926 semblent présenter un comportement fort proche de celui d'HUVECs en réponse à un lipide bioactif tel l'acide lysophosphatidique (Gustin, Van Steenbrugge et al. 2008) ou à l'hypoxie (Toffoli, Feron et al. 2007; Flamant, Toffoli et al. 2009; Toffoli, Roegiers et al. 2009). Bien qu'elles diffèrent des cellules endothéliales *in vivo*, les cellules EAhy926 constituent donc un modèle de choix dans l'étude portant sur des cellules endothéliales *in vitro* (Emeis and Edgell 1988). Enfin, bien que les cellules EAhy926 et HUVECs dérivent de cellules de veine, il s'agit de lignées cellulaires fort utilisées également dans le contexte de maladies artérielles, telle l'athérosclérose. (Hunter and Turner 2006; Piqueras, Reynolds et al. 2007; Liu, Huang et al. 2009; Liu and Shen 2009)

Afin de générer du peroxy-nitrite, nous avons utilisé le SIN-1 dans la majeure partie de ce mémoire. Pour rappel (voir point 2.2.2. de l'Introduction et Figures I.11. et I.12.), le SIN-1 est décrit pour permettre la formation de peroxy-nitrite. Nous avons donc voulu mesurer la formation de peroxy-nitrite dans des cellules EAhy926 et dans des HUVECs de manière directe, en suivant l'oxydation de la sonde HPF ou indirecte, via l'étude de la formation de 3-NT, induite par des molécules actives dérivées du peroxy-nitrite (voir point 3.1.3. de l'Introduction). Toutefois, le recours à ces méthodes a nécessité certaines mises au point afin d'optimiser cette détection de peroxy-nitrite. Ces mises au point sont décrites ci-dessous.

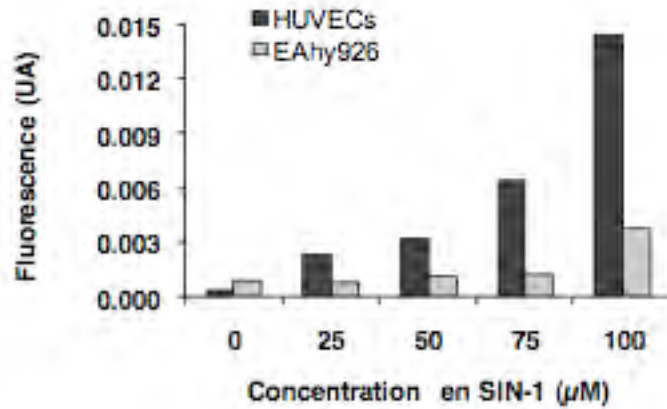
#### 1. Optimisation des méthodes de détection du peroxy-nitrite

##### 1.1. Test de sensibilité de la sonde HPF

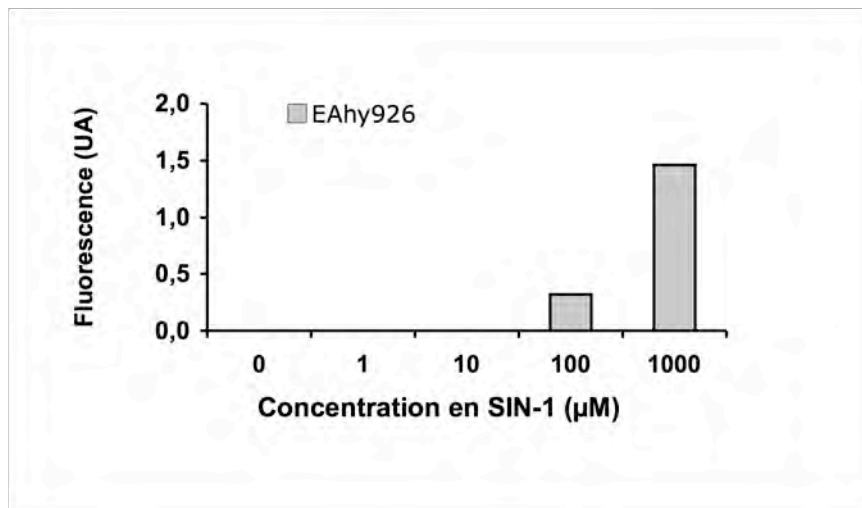
Afin d'améliorer la sensibilité de la sonde HPF, nous avons optimisé son incorporation dans des cellules endothéliales. Trois solutions ont été testées pour diluer la sonde : l'HBS (proposé par la firme Bachem), l'HBSS (ou solution de Hank) et le DMEM (milieu de culture). Ainsi, les cellules EAhy926 et les HUVECs ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits. Le jour de l'expérience, les cellules ont été incubées en présence de la sonde HPF diluée dans ces 3 solutions (HBS, HBSS, DMEM), pendant 40 minutes. Nous avons observé une intensité de fluorescence accrue dans les cellules traitées au



A

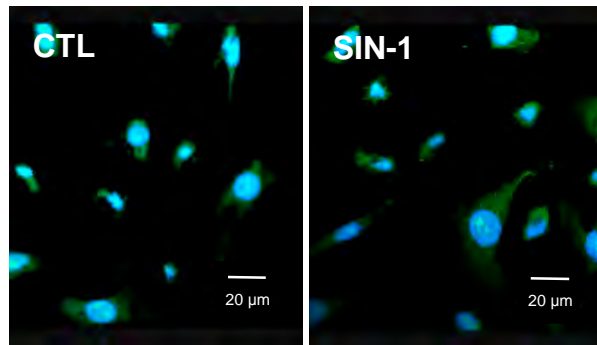


B

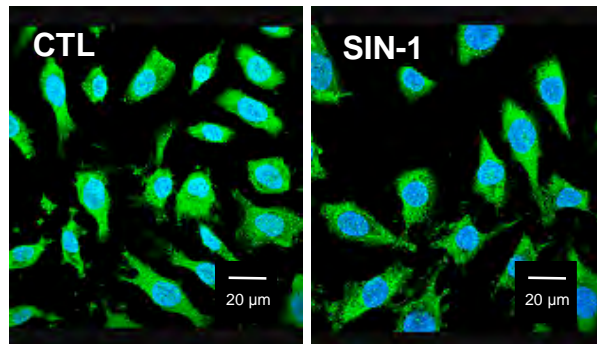


**Figure III.1. Caractérisation de la formation de peroxynitrite à partir de SIN-1 dans des cellules endothéliales EAhy926 et HUVECs.** Après incorporation de la sonde HPF pendant 40 minutes, les cellules ont été stimulées pendant 1 heure avec du SIN-1 à des concentrations croissantes comprises entre (A) 25-100  $\mu\text{M}$  et (B) 100-1.000  $\mu\text{M}$ . La fluorescence liée à la formation de peroxynitrite est exprimée en unités arbitraires (UA) et lue à 520 nm (n=1).

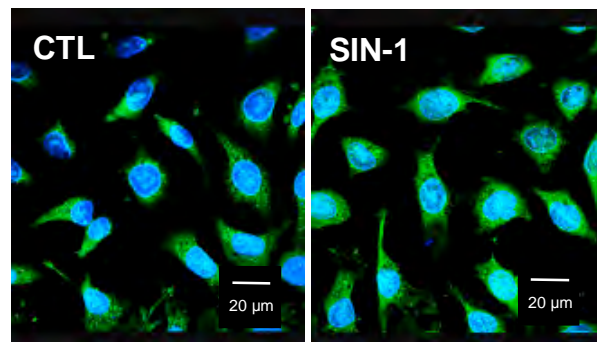
### A. Fixation PFA



### B. Fixation éthanol - acide acétique



### C. Fixation méthanol – acétone



**Figure III.2. Etude de l'effet du SIN-1 sur la formation de 3-nitrotyrosines (3-NT) dans des cellules endothéliales EAhy926.** Nous avons réalisé un marquage immunocytochimique des 3-NT dans des cellules endothéliales stimulées avec du SIN-1 5 mM pendant 6 heures. La fixation s'est effectuée en présence de (A) PFA, (B) Ethanol – Acide acétique ou (C) Méthanol – Acétone. Les 3-NT sont révélées par immunofluorescence via l'utilisation d'un anticorps primaire anti-3-NT de souris et d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à un Alexa 488 nm. La visualisation se fait en microscopie confocale à l'aide de l'objectif 63 X.

SIN-1 lorsque la sonde est incorporée dans les cellules en présence d'HBSS (résultats non montrés). Ensuite, nous avons testé la sensibilité de la sonde HPF au peroxy-nitrite en traitant des cellules EAhy926 et des HUVECs pendant 1 heure avec du SIN-1 (25, 50, 75, 100 ou 1000  $\mu$ M). La formation de peroxy-nitrite était détectée dans des cellules stimulées avec 1000  $\mu$ M de SIN-1 (résultats non montrés) et 100  $\mu$ M mais pas pour des concentrations plus faibles (**Fig. III.1**). De plus, nous avons constaté que la formation de peroxy-nitrite était de 2 à 6 fois plus importante dans les HUVECs que dans les cellules EAhy926.

Sur base de nos résultats, nous pouvons conclure qu'il est possible de détecter la fluorescence associée à la formation de peroxy-nitrite, après oxydation de la sonde HPF, à partir de 100  $\mu$ M de SIN-1. De plus, nous obtenons de meilleurs résultats en présence d'HBSS, comparé à l'HBS ou au DMEM. Les HUVECs semblent plus sensibles au SIN-1 que les cellules EAhy926.

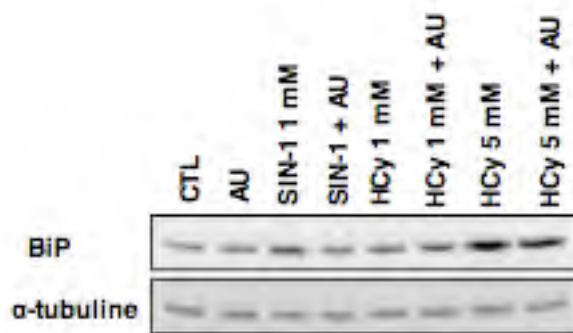
### 1.2. Etude de la formation de 3-NT par immunocytochimie – Comparaison de 3 protocoles

Dans la littérature, les 3-NT sont décrites en tant que biomarqueurs de maladies cardiovasculaires, en aval de la formation de peroxy-nitrite (Reiter, Teng et al. 2000). Cette modification protéique peut être étudiée par immunocytochimie (IC) ou par Western blot. Pour le marquage immunocytochimique, les cellules ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits sur des lames couvre-objet. Le jour de l'expérience, les cellules ont été mises au repos pendant 1 heure, puis stimulées pendant 6 heures avec du SIN-1 (5 mM). Nous avons à notre disposition un anticorps anti-3-NT (Millipore), avec une fixation (recommandée sur la fiche technique) à l'éthanol/acide acétique. Dans ce protocole, la firme suggère de perméabiliser les cellules avant stimulation (au lieu de stimuler avant la perméabilisation des cellules). Au vu de ce protocole particulier proposé sur la fiche technique, nous l'avons adapté et comparé avec 2 autres méthodes de fixation, avec du méthanol/acétone ou du paraformaldéhyde (PFA). Les résultats ont été analysés par microscopie confocale.

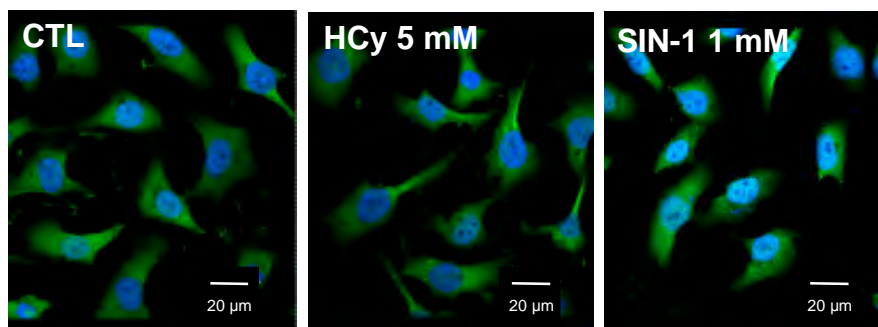
A la **Fig.III.2**, nous constatons un signal fluorescent plus important dans les cellules fixées avec l'éthanol/acide acétique, comparé aux 2 autres types de fixation, avec un bruit de fond important. Cependant, nous n'avons pas observé de différence entre les conditions contrôle (CTL) et SIN-1, quelle que soit la fixation utilisée. Nous n'avons pas poursuivi ces mises au point puisque la détection des 3-NT avait déjà été mise au point avec succès par Laurine Mattart au laboratoire dans le cadre de sa thèse. Des Western blots ciblés sur les 3-NT seront d'ailleurs présentés plus loin dans ce travail (**Fig.III.7 et III.12**).

## 2. Développement d'un système expérimental plus physiologique de formation de peroxy-nitrite

Dans le cadre de sa thèse, Laurine Mattart a développé un modèle expérimental de génération de peroxy-nitrite qui consiste à exposer des cellules endothéliales en culture au SIN-1 (Mattart *et al.*, en révision). Nous avons voulu compléter ce modèle par des approches plus physiologiques pour induire la formation de peroxy-nitrite. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur des données publiées dans la littérature. Nous avons choisi 4 types de stimulation décrites pour favoriser la formation de peroxy-nitrite et pertinentes dans le contexte du dysfonctionnement endothélial et de l'athérosclérose.



**Figure III.3. Etude de l'effet de l'homocystéine sur l'expression de BiP.** Analyse en Western blot à partir d'extraits totaux de cellules EAhy926. Les cellules EAhy926 ont été mises au repos pendant 36 heures, puis stimulées avec de l'homocystéine (HCy) à 1 ou 5 mM pendant 18 heures. Le SIN-1 (1 mM) constitue un contrôle positif et l'acide urique (AU) (1 mM) est un *scavenger* de peroxynitrite. L'anticorps primaire anti-BiP (78 kDa) a été dilué 1 :1.000 fois dans la solution de « blocking » contenant du TBS-t + 2 % de lait « Amersham » et a été déposé sur la membrane, toute la nuit à 4°C. L'anticorps secondaire a été dilué 1 :200.000 fois dans la solution de « blocking » et mis à incuber en présence de la membrane 1 heure à température ambiante. L'α-tubuline (55 kDa) est utilisée comme contrôle de charge. L'anticorps primaire a été dilué 1 :50.000 fois et mis à incuber en présence de la membrane 30 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire a été dilué 1 :200.000 fois et mis à incuber 30 minutes à température ambiante. La révélation s'est effectuée avec l'appareil photo Image Quant 350 (n=1).



**Figure III.4. Etude de l'effet de l'homocystéine sur la localisation subcellulaire de Nrf2.** Nous avons suivi la translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 suite à la stimulation des cellules endothéliales EAhy926 avec de l'homocystéine (HCy) à 5 mM pendant 3 heures. Le SIN-1 (1 mM) constitue un contrôle positif. La translocation nucléaire de Nrf2 est révélée par immunofluorescence via l'utilisation d'un anticorps primaire anti-Nrf2 de lapin et d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à un Alexa 488 nm. La visualisation se fait en microscopie confocale à l'aide de l'objectif 63 X.

### 2.1. Stimulation de cellules endothéliales avec l'Homocystéine (HCy)

Dans la littérature, l'HCy a été décrite pour favoriser la formation de peroxy-nitrite mais aussi pour activer l'UPR dans des HUVECs (Zhang, Li et al. 2000);(Zhang, Cai et al. 2001). Nous avons donc tenté cette approche dans les cellules endothéliales.

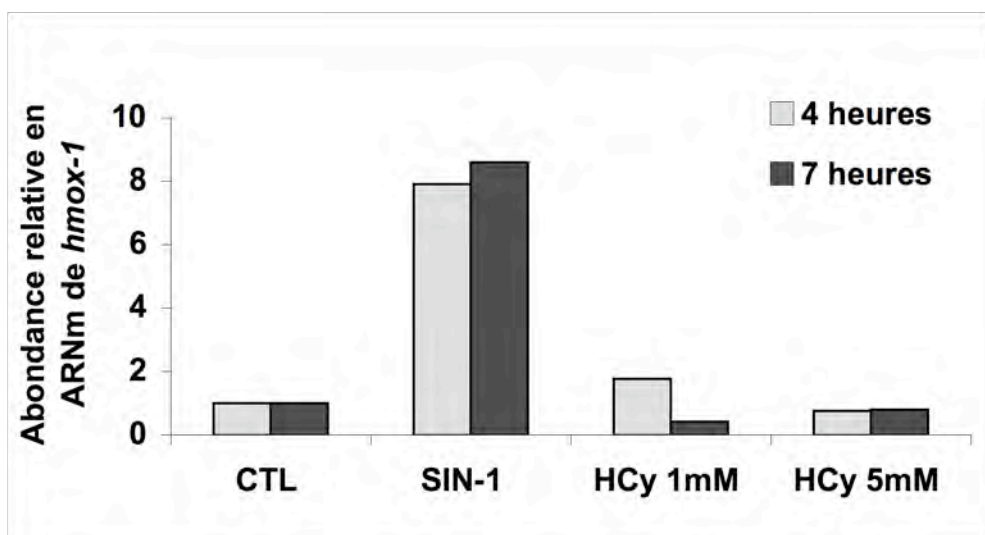
#### 2.1.1. Etude de l'activation de la voie UPR dans des cellules endothéliales stimulées avec l'HCy

Comme Aurélie Tacheney avait déjà eu des problèmes avec l'HCy (communication personnelle), nous avons d'abord voulu voir si l'HCy utilisée était bien active. Il a été décrit dans la littérature que l'HCy induit l'activation de la voie UPR dans les cellules endothéliales (Zhang, Cai et al. 2001). Zhang *et al.* ont étudié par Western blot les variations d'abondance de la protéine BiP, une foldase du RE dont l'abondance augmente lors de l'activation de la voie UPR. Leurs résultats révèlent que BiP est induit au niveau protéique dans des HUVECs, après 12 heures de stimulation en présence d'HCy 3 mM. Afin de s'assurer que l'HCy était active dans notre modèle, les cellules EAhy926 ont été repiquées en T25 deux jours avant l'expérience et mises au repos pendant 1 heure. Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 18 heures en présence d'HCy (1 mM ou 5 mM). Du SIN-1 (1 mM) est utilisé comme contrôle positif et l'acide urique (AU) (1 mM) comme *scavenger* de peroxy-nitrite. La présence du contrôle positif permet de s'assurer que la manipulation s'est déroulée avec la même efficacité dans toutes les conditions. Les protéines ont ensuite été lysées dans le tampon d'extraction TRIS-HCl. Nous avons observé une augmentation d'abondance de BiP dans la condition SIN-1, cette augmentation n'étant pas détectée en présence d'AU (**Fig. III.3**). De plus, nous avons mis en évidence une augmentation de l'abondance de BiP en présence d'HCy 5 mM, laquelle est légèrement moins importante en présence d'AU.

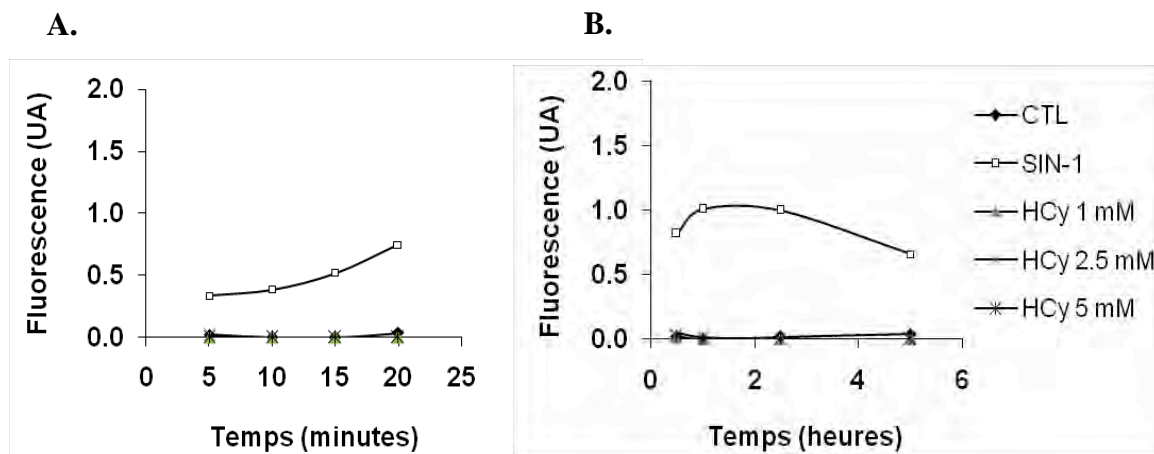
Les résultats obtenus suggèrent que l'HCy est active et induit un stress au niveau du RE, mais à forte concentration uniquement, dépassant nettement les valeurs pathophysiologiques. En effet, la concentration en HCy est de l'ordre de 5 à 10  $\mu$ M chez des individus normaux, et de plus de 100  $\mu$ M chez des individus atteints d'une HHCy sévère (Cheng, Yang et al. 2009). Par ailleurs, cette induction de BiP par l'HCy n'est pas empêchée en présence de 5 mM d'AU, indiquant que l'effet observé sur BiP n'est pas dû au peroxy-nitrite.

#### 2.1.2. Etude de l'activation de la voie Nrf2 dans des cellules endothéliales stimulées avec l'HCy

Sachant que le peroxy-nitrite active aussi la voie Nrf2, nous avons voulu étudier l'activation de cette voie, en présence d'HCy (Liu et al., 2005). Nous souhaitons donc déterminer si l'HCy a un effet sur les cellules. Nous avons tout d'abord suivi la translocation nucléaire de Nrf2 par immunofluorescence et microscopie confocale. Ensuite, nous avons suivi l'expression par RT-PCR en temps réel de l'un des gènes cibles de Nrf2, l'hème oxygénase 1 (*hmox-1*). En ce qui concerne le marquage immunocytochimique, les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits. Le jour du marquage, les cellules ont été mises au repos pendant 1 heure et stimulées pendant 3 heures avec de l'HCy 5 mM. Le SIN-1 (1 mM) constitue le contrôle positif. Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) et marquées avec un anticorps anti-Nrf2. Nous avons constaté la présence d'un signal fluorescent uniquement dans le noyau des cellules stimulées



**Figure III.5. Etude de l'effet de l'homocystéine sur l'expression au niveau ARNm de *hmx-1*.** Le graphe représente l'abondance relative de l'ARNm de *hmx-1* après une stimulation de 4 ou 7 heures avec de l'homocystéine (HCy) à 1 mM ou 5 mM. Le SIN-1 (1 mM) constitue un contrôle positif. Analyse par RT-PCR en temps réel. Le gène *RPL13A* a été choisi comme gène de maintenance pour exprimer les niveaux d'induction relatifs. Les contrôles ont été rapportés à 1 (n=1).



**Figure III.6. Etude de l'oxydation de la sonde HPF par le peroxynitrite dans les cellules EAhy926 en présence d'homocystéine.** Après avoir incorporé la sonde HPF, les cellules EAhy926 ont été stimulées pendant 5-20 minutes (A) ou 0.5-5 heures (B) avec de l'homocystéine (HCy) à 1; 2,5 ou 5 mM. Le SIN-1 (500  $\mu$ M) constitue un contrôle positif. La formation de peroxynitrite est exprimée à partir des valeurs brutes. Le graphe représente la fluorescence à 520 nm émise par la sonde HPF, exprimée en unités arbitraires (UA) (n=2).

avec du SIN-1. Nous n'avons pas constaté de translocation du facteur de transcription Nrf2 dans les conditions traitées avec de l'HCy, malgré les concentrations élevées en HCy (**Fig. III.4**).

*Hmox-1*, un des gènes cibles de la voie Nrf2, est connu pour être sensible aux stress induits par l'HCy dans des cellules musculaires lisses (Liu, Peyton et al. 2005). Nous avons suivi son expression au niveau ARNm (**Fig. III.5**). Les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en T25, mises au repos pendant 1 heure et stimulées pendant 4 ou 7 heures en présence d'HCy (1 ou 5 mM). Le SIN-1 (1 mM) constitue le contrôle positif. Après stimulation, nous avons procédé à l'extraction d'ARN, suivie d'une rétrotranscription et d'une analyse de l'expression en ARNm par RT-PCR en temps réel. Le contrôle positif induit une augmentation d'abondance de plus de 8 fois de l'ARNm *hmox-1*. Par contre, nous n'avons pas observé d'induction de *hmox-1* par l'HCy, ni à une concentration de 1 mM en HCy, ni à 5 mM (**Fig. III.5**).

Finalement, nous n'avons pas observé d'activation de la voie Nrf2 dans les cellules endothéliales en présence d'HCy

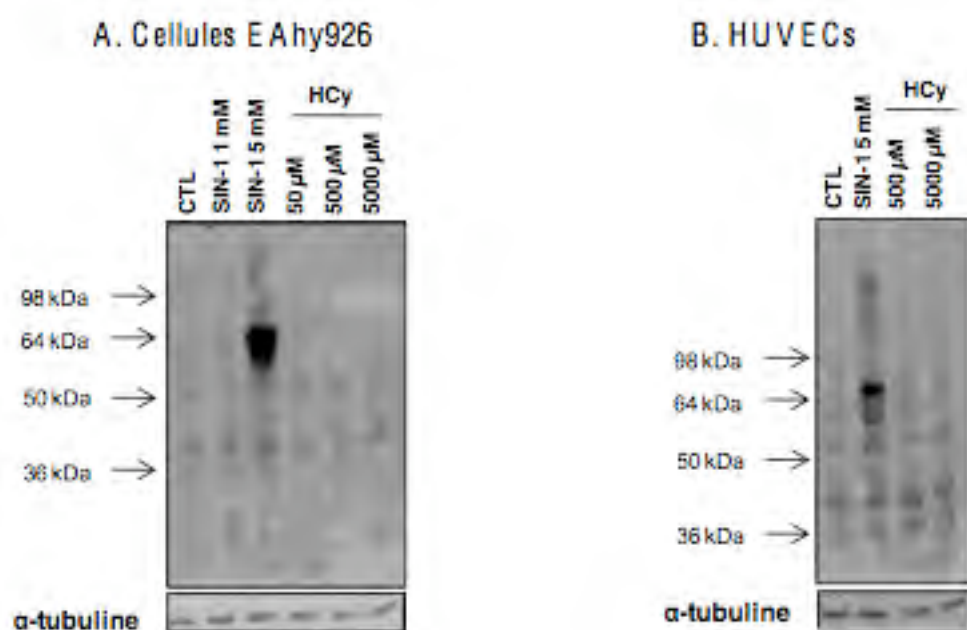
### *2.1.3. Mesure directe de la formation de peroxynitrite dans des cellules endothéliales stimulées avec l'HCy*

Pour finir l'étude des effets de l'HCy, nous avons tenté de détecter la formation de peroxynitrite, de manière **directe**, en suivant l'oxydation de la sonde HPF. Les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits et incubées en présence de la sonde HPF pendant 40 minutes. Ensuite, les cellules ont été stimulées en présence d'HCy (1; 2,5 ou 5 mM) pendant des temps courts (5 à 20 minutes) ou des temps longs (0,5 à 5 heures). Le SIN-1 (500 µM) est utilisé comme contrôle positif, à chaque temps de stimulation. Nous n'avons pas détecté de fluorescence, ni pour des temps allant de 5 à 20 minutes de stimulation (**Fig. III.6A**), ni pour des temps plus longs (30 minutes à 8 heures de stimulation) (**Fig. III.6B**). Pourtant, la formation de peroxynitrite est bien observée dans les cellules stimulées avec du SIN-1, ce qui confirme que la sonde était fonctionnelle (**Fig. III.6**).

En conclusion, nous ne sommes pas parvenus à détecter la formation de peroxynitrite en suivant l'oxydation de la sonde HPF, dans des cellules stimulées avec l'HCy. Il se peut que la sonde HPF ne constitue pas un moyen suffisamment sensible pour détecter les quantités de peroxynitrite générées en présence d'HCy. Les concentrations en HCy ainsi que les temps de stimulation en présence de la sonde HPF peuvent également être remis en question. Afin de détecter la formation de peroxynitrite en présence d'HCy, nous avons eu recours à une méthode indirecte de détection de peroxynitrite, basée sur l'étude de la formation de 3-nitrotyrosines (3-NT).

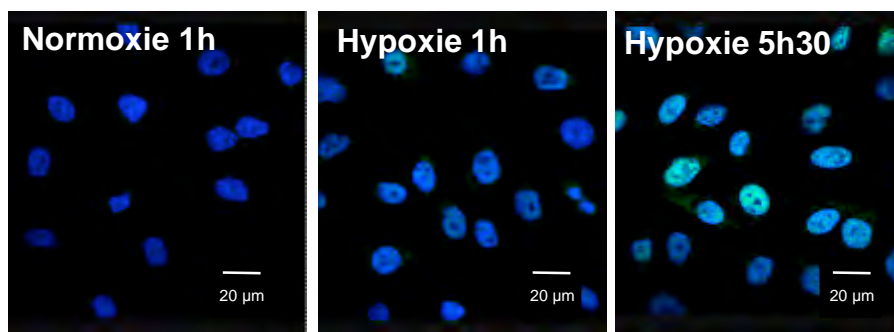
### *2.1.4. Mesure indirecte de la formation de peroxynitrite dans des cellules endothéliales stimulées avec l'HCy*

Nous avons donc étudié la formation de peroxynitrite, via la détection de ces 3-NT par Western blot. Par ailleurs, nous avons décidé de comparer la formation de ces 3-NT dans des cellules EAhy926 et des HUVECs. En effet, la plupart des articles ayant mis en évidence des 3-NT portaient sur des HUVECs. De plus, les HUVECs sont des cellules en primo-culture, connues pour être plus sensibles au stress, comparé aux cellules EAhy926. Les cellules EAhy926 et les HUVECs ont donc été repiquées en T25 deux jours avant l'expérience, mises

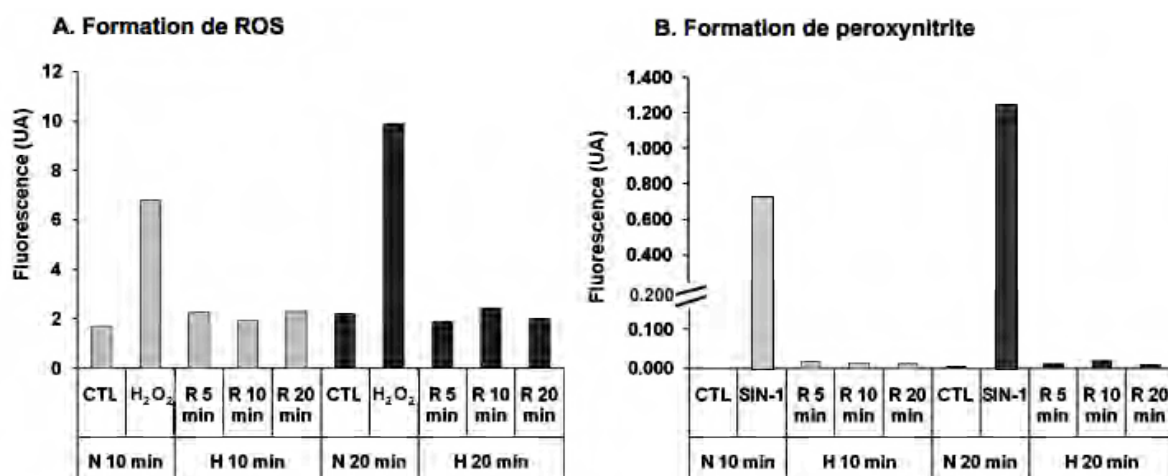


**Figure III.7. Etude des effets de l'homocystéine sur la formation de peroxynitrite par la détection de 3-nitrotyrosines (3-NT).** Analyse en Western blot à partir d'extraits totaux. Les cellules EAhy926 (A) ou HUVECs (B) ont été stimulées pendant 24 heures avec de l'homocystéine (HCy) à 50; 500 ou 5.000  $\mu$ M. Le SIN-1 (1 ou 5 mM) constitue un contrôle positif. L'anticorps primaire anti-3-NT a été dilué 1:1.000 fois dans la solution de « blocking » contenant du TBS-t + 2 % de lait « Amersham » et mis à incuber en présence de la membrane, toute la nuit à 4°C. L'anticorps secondaire a été dilué 1 :200.000 fois dans la solution de « blocking » et mis à incuber en présence de la membrane 1 heure à température ambiante. L' $\alpha$ -tubuline (55 kDa) est utilisée comme contrôle de charge. L'anticorps primaire a été dilué 1 :50.000 fois et mis à incuber en présence de la membrane 30 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire a été dilué 1 :200.000 fois et mis à incuber 30 minutes à température ambiante. La révélation s'est effectuée avec l'appareil photo Image Quant 350 (n=1).





**Figure III.8. Etude de l'effet de l'hypoxie sur l'abondance de la protéine HIF-1  $\alpha$ .** Nous avons suivi la translocation nucléaire du facteur de transcription HIF-1  $\alpha$  dans les cellules EAhy926 incubées en normoxie pendant 1 heure ou en hypoxie pendant 1 heure ou 5 heures 30 minutes. HIF-1  $\alpha$  est révélée par immunofluorescence via l'utilisation d'un anticorps primaire anti-HIF-1  $\alpha$  de lapin et d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à un Alexa 488 nm. La visualisation se fait en microscopie confocale à l'aide de l'objectif 63 X (n=1).



**Figure III.9. Etude de l'effet d'un cycle d'hypoxie-réoxygénation sur la formation de ROS (A) ou de peroxynitrite (B).** Après incorporation de la sonde H<sub>2</sub>DCFDA (A) ou HPF (B), les cellules EAhy926 ont été incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H) pendant 10 ou 20 minutes. L'hypoxie était suivie d'une réoxygénation (R) de 5, 10 ou 20 minutes. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500  $\mu$ M) ou le SIN-1 (500  $\mu$ M) constituent des contrôles positifs pour la sonde H<sub>2</sub>DCFDA ou HPF, respectivement. La formation de ROS ou de peroxynitrite est exprimée à partir des valeurs brutes. Le graphe représente la fluorescence à 520 nm, exprimée en unités arbitraires (UA) (n=2).

au repos pendant 1 heure et stimulées pendant 24 heures en présence d'HCy (50; 500 ou 5000  $\mu$ M). Du SIN-1 (1 mM ou 5 mM) est utilisé comme contrôle positif et l'acide urique (AU) comme *scavenger* de peroxynitrite. Les cellules ont ensuite été lysées dans le tampon d'extraction TRIS-HCl. Nous avons constaté la formation de trainées (*smears*) uniquement dans le contrôle positif à 5 mM, correspondant à l'ensemble des protéines porteuses de 3-NT. C'est pourquoi nous avons décidé de travailler avec du SIN-1 5 mM, au lieu de 1 mM, pour étudier la formation de 3-NT. Cependant, nous n'avons pas observé de *smears* dans les cellules traitées avec l'HCy, ni pour les cellules EAhy926 (**Fig. III.7A**), ni pour les HUVECs (**Fig. III.7B**).

Nous avons essayé d'affiner la méthode en exploitant la technique d'immunoprécipitation dans laquelle les protéines sont purifiées à l'aide de billes sur lesquelles sont fixés des anticorps anti-3-NT. Les cellules ont été repiquées la veille de l'expérience en T25 et stimulées pendant 24 heures en présence de SIN-1 (5 mM). Les cellules ont ensuite été lysées dans le tampon d'extraction RIPA et les résultats analysés par Western blot, malheureusement sans succès (résultats non montrés).

En résumé, nos résultats indiquent que l'HCy n'active pas la voie Nrf2 dans notre modèle d'étude, ni dans les HUVECs, ni dans les cellules EAhy926. Nous ne détectons pas non plus la formation de peroxynitrite en présence d'HCy. Par ailleurs, l'HCy à une concentration de 5 mM est capable d'induire l'expression de BiP, suggérant que l'HCy a bien un effet sur les cellules. Néanmoins, la concentration en HCy de 5 mM dépasse largement les concentrations patho-physiologiques en HCy. Nous avons donc décidé d'abandonner l'HCy et de recourir à un système d'hypoxie-réoxygénation, décrit dans la littérature comme générant des ROS, dont le peroxynitrite (Zou and Bachschmid 1999).

### 2.2. Expériences d'hypoxie et/ou de réoxygénation dans des cellules endothéliales

#### 2.2.1 Etude de la protéine HIF-1 $\alpha$ comme marqueur d'hypoxie dans des cellules endothéliales

Afin de nous assurer que l'hypoxie appliquée était bien effective, nous avons suivi l'abondance d'HIF-1  $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1) considéré comme acteur moléculaire essentiel dans l'hypoxie. En effet, HIF-1  $\alpha$  est connu dans la littérature pour être stabilisé en conditions hypoxiques (Toffoli and Michiels 2008). *In vitro*, l'hypoxie est réalisée en passant d'une atmosphère de 95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub> à une atmosphère de 95 % N<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>.

Nous avons donc suivi la translocation nucléaire du facteur HIF-1  $\alpha$  par immunocytochimie (IC) en utilisant un anticorps anti-HIF-1  $\alpha$ . Les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits. Le jour de la manipulation, les cellules ont été mises au repos pendant 1 heure, puis incubées en normoxie pendant 1 heure ou en hypoxie pendant 1 heure ou 5 heures 30 minutes. Suite à ce stress, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) et marquées avec un anticorps anti-HIF-1  $\alpha$ . Les résultats ont été analysés par microscopie confocale. Nous avons bien constaté une augmentation de l'abondance de la protéine HIF-1  $\alpha$  après 1 heure d'hypoxie ainsi que sa translocation nucléaire après 5 heures 30 minutes d'hypoxie (**Fig. III.8**).

Notre système expérimental permet bien d'induire des conditions hypoxiques.

### 2.2.2. Effet de l'hypoxie sur la génération de ROS dans des cellules endothéliales

L'hypoxie-réoxygénation (H/R) est connue pour générer des ROS et, en particulier, du peroxynitrite au sein de cellules endothéliales. En pratique, nous avons réalisé l'hypoxie en présence des sondes HPF ou H<sub>2</sub>DCFDA, dans le but de détecter la formation de peroxynitrite ou de ROS, respectivement.

Lors de cette expérience, les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits et incubées le lendemain en présence des sondes HPF ou H<sub>2</sub>DCFDA, pendant 40 minutes. Les HUVECs ont ensuite été incubées sous hypoxie (H) pendant 10 ou 20 minutes, suivie d'une réoxygénation (R) pendant 5 ou 20 minutes. Nous avons également incubé les cellules en conditions normoxiques en guise de contrôle. Le SIN-1 (500 µM) ou l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM) constituent des contrôles positifs pour les sondes HPF ou H<sub>2</sub>DCFDA, respectivement. Nous n'avons pas obtenu de résultats significatifs dans nos conditions tests alors que nous détectons un effet dans les conditions SIN-1 ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. III.9**). De même, nous avons également placé des HUVECs, en hypoxie pendant 20 ou 30 minutes. Nous ne détectons pas non plus la génération de ROS, après H/R dans des HUVECs (résultats non montrés).

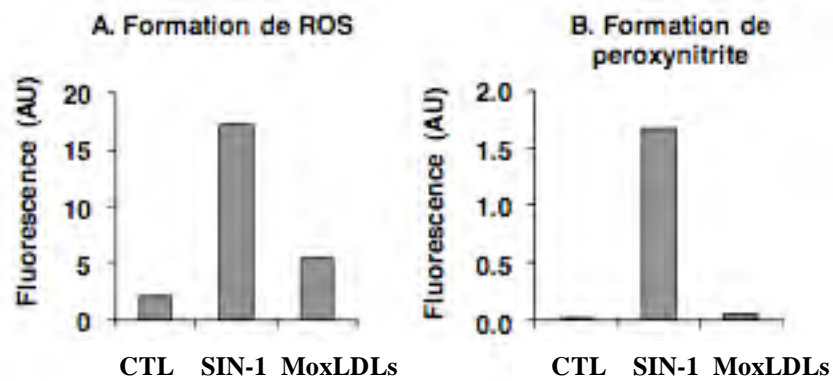
En conclusion, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence une génération de ROS avec le système d'hypoxie-réoxygénation, ni dans des cellules EAhy926, ni dans des HUVECs. La maîtrise du système d'hypoxie-réoxygénation ainsi que l'optimisation des temps d'incubation sont délicates et pourraient être remises en question. Il n'est donc pas exclu que les conditions d'hypoxie et de réoxygénation testées n'étaient pas adéquates pour induire la génération de peroxynitrite.

### 2.3. Mesure directe de la formation de peroxynitrite dans des cellules endothéliales stimulées avec des MOxLDLs

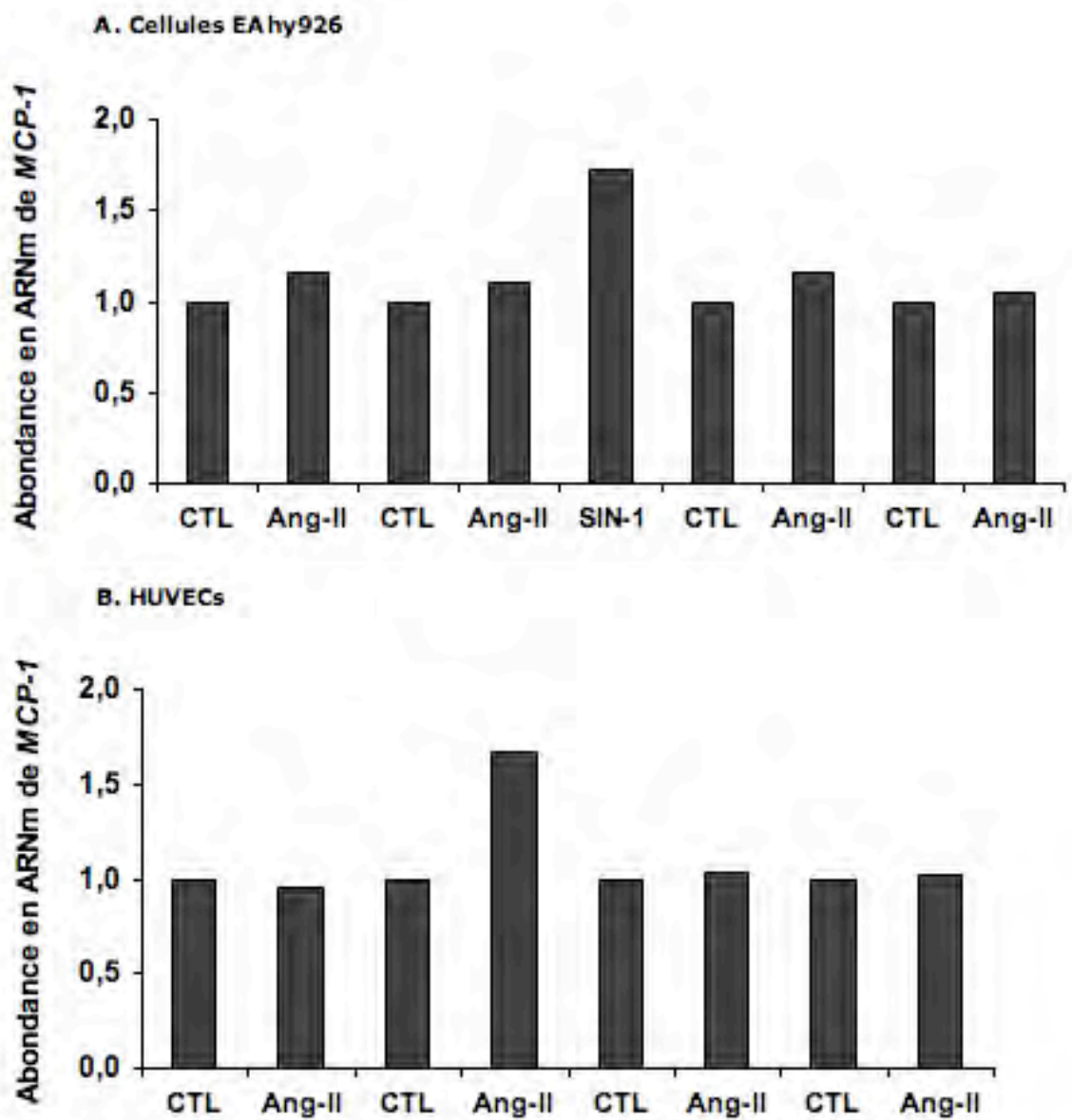
Notre laboratoire s'intéresse également aux effets induits par les LDLs oxydées par le cuivre (OxLDLs) ou par la myéloperoxydase (MoxLDLs) sur les macrophages et les cellules endothéliales. Par ailleurs, Calay et *al.* (2010) ont mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif en présence de MoxLDLs et de OxLDLs en macrophages murins RAW 264.7, avec des effets plus marqués pour les MoxLDLs. Ledovina Alaimo (mémoire de Master BBMC 2010-2011) a également montré que seules les MoxLDL déclenchent un stress oxydatif en cellules EAhy926, contrairement aux OxLDLs. C'est pour cette raison que nous n'avons testé que les MoxLDLs.

Les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits et incubées en présence de la sonde H<sub>2</sub>DCFDA (détection de ROS) pendant 40 minutes. **Figure III.10A**, les cellules ont été stimulées pendant 1 heure en présence de MoxLDLs (100 µg/ml). Le SIN-1 (500 µM) constitue le contrôle positif. Nous constatons une oxydation de la sonde H<sub>2</sub>DCFDA (**Fig. III.10A**). Cela suggère que les MoxLDLs sont actives, puisqu'elles exercent un effet sur les cellules et induisent la génération de ROS.

Suite à cela, nous avons déterminé si, parmi ces ROS, du peroxynitrite était également formé dans les cellules endothéliales, sous ces conditions. Les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits et incubées en présence de la sonde HPF (détection de peroxynitrite) pendant 40 minutes. Nous n'avons pas détecté la formation de



**Figure III.10. Etude de l'effet des MoxLDLs sur la formation de ROS ou de peroxynitrite.** Après incorporation de la sonde H<sub>2</sub>DCFDA (A) ou HPF (B), les cellules EAhy926 ont été incubées en présence de MoxLDLs (100 µg/ml) pendant 1 heure. Le SIN-1 (500 µM) constitue le contrôle positif. La formation de ROS ou de peroxynitrite est exprimée à partir des valeurs brutes. Le graphe représente la fluorescence à 520 nm, exprimée en unités arbitraires (UA) (n=2).



**Figure III.11. Etude de l'effet de l'angiotensine-II sur l'expression au niveau ARNm de *MCP-1*.** Le graphe représente l'abondance relative de l'ARNm de *MCP-1* après une stimulation de 2, 4, 6 ou 8 heures avec de l'angiotensine-II (Ang-II) à 100 nM, des cellules EAhy926 (A) ou HUVECs (B). Le SIN-1 (1 mM) constitue un contrôle positif pour la figure A. Analyse par RT-PCR en temps réel. Le gène *RPL13A* a été choisi comme gène de maintenance pour exprimer les niveaux d'induction relatifs. Les contrôles ont tous été rapportés à 1 (n=2).

peroxynitrite par oxydation de la sonde HPF en présence des MoxLDLs, mais bien dans la condition SIN-1 (**Fig. III.10A**).

L'absence de détection de peroxynitrite peut s'expliquer soit par un manque de sensibilité de la sonde HPF face à une trop faible formation de peroxynitrite induite par les MoxLDLs, soit par une absence de formation de peroxynitrite.

En conclusion, ni en présence d'HCy, ni lors d'une H/R, ni en présence de MoxLDLs, nous n'avons observé de formation de peroxynitrite dans les cellules endothéliales. Dans le but d'étudier des systèmes de formation de peroxynitrite plus physiologiques, nous avons testé une dernière molécule : l'Angiotensine-II (Pueyo, Arnal et al. 1998) (après discussion avec le Professeur Chantal Dessy, UCL, Woluwé).

### 2.4. Stimulation de cellules endothéliales avec l'Angiotensine-II (Ang-II)

#### *2.4.1. Etude de l'expression de MCP-1 dans des cellules endothéliales stimulées avec l'Ang-II seule*

Lors de cette expérience, nous avons comparé l'effet de l'Ang-II sur, à la fois des HUVECs et des cellules EAhy926. En effet, nous savons que les HUVECs sont pourvues d'un récepteur à l'Ang-II. Quant aux cellules EAhy926, théoriquement pourvues du récepteur à l'Ang-II, elles ne répondent pas toujours à l'Ang-II. Cette perte de sensibilité pourrait être due au caractère hybride des cellules EAhy926, résultant en « la perte ou la transformation des caractéristiques de cellule endothéliale » (Benndorf, Boger et al. 2003). Une autre hypothèse serait que la présence ou l'absence de récepteur à l'Ang-II dans les cellules EAhy926 dépend du nombre de passages en culture, après décongélation des cellules (d'après une discussion avec le Professeur Karim Zouaoui Boutjeltia, CHU Charleroi) et pourrait donc varier selon des sous-clones de cellules EAhy926.

Dans un premier temps, nous avons donc voulu vérifier si les cellules EAhy926 répondaient ou non à l'Ang-II. Pour ce faire, nous avons testé l'effet de l'Ang-II sur l'expression en ARNm de *MCP-1*, un gène impliqué dans le recrutement de monocytes lors de l'inflammation. En effet, Yamagishi et son équipe ont récemment montré une induction de l'expression de *MCP-1*, aux niveaux ARNm et protéine, en stimulant des HUVECs pendant 4 heures en présence d'Ang-II (100 nM). Sur base de l'article de Yamagishi, nous avons analysé l'expression de l'ARNm de *MCP-1*. Les cellules EAhy926 ont donc été repiquées la veille de l'expérience en T25, mises au repos pendant 1 heure et stimulées pendant 2, 4, 6 ou 8 heures en présence d'Ang-II (100 nM). Les cellules ont également été incubées avec le SIN-1 (1 mM) pendant 4 heures. La présence du contrôle positif SIN-1 permet de s'assurer que la manipulation s'est déroulée avec la même efficacité dans les cellules EAhy926 que dans les HUVECs. Nous constatons un effet sur l'expression de *MCP-1* dans les cellules EAhy926, après 4 heures de stimulation au SIN-1 mais pas dans les conditions Ang-II (**Fig. III.11A**). Cependant, nous avons observé un effet de l'Ang-II sur l'expression de *MCP-1* dans les HUVECs au temps 4 heures (**Fig. III.11B**).

En conclusion, l'Ang-II induit l'expression de *MCP-1* dans les HUVECs, mais pas dans les cellules EAhy926.

Les cellules EAhy926 répondent donc moins bien à l'Ang-II, par rapport aux HUVECs. En effet, comme mentionné plus haut, cette perte de sensibilité à l'Ang-II peut être

expliquée par le caractère hybride des cellules EAhy926 ou encore l'absence de récepteur à l'Ang-II. Par ailleurs, les concentrations en Ang-II utilisées pour stimuler les cellules EAhy926 pourraient être remises en question et être revues à la hausse.

Sur base de ces résultats, nous avons choisi de tester à nouveau l'Ang-II, en travaillant uniquement sur HUVECs.

### *2.4.2. Mesure directe de la formation de peroxynitrite dans des cellules endothéliales stimulées avec l'Ang-II seule*

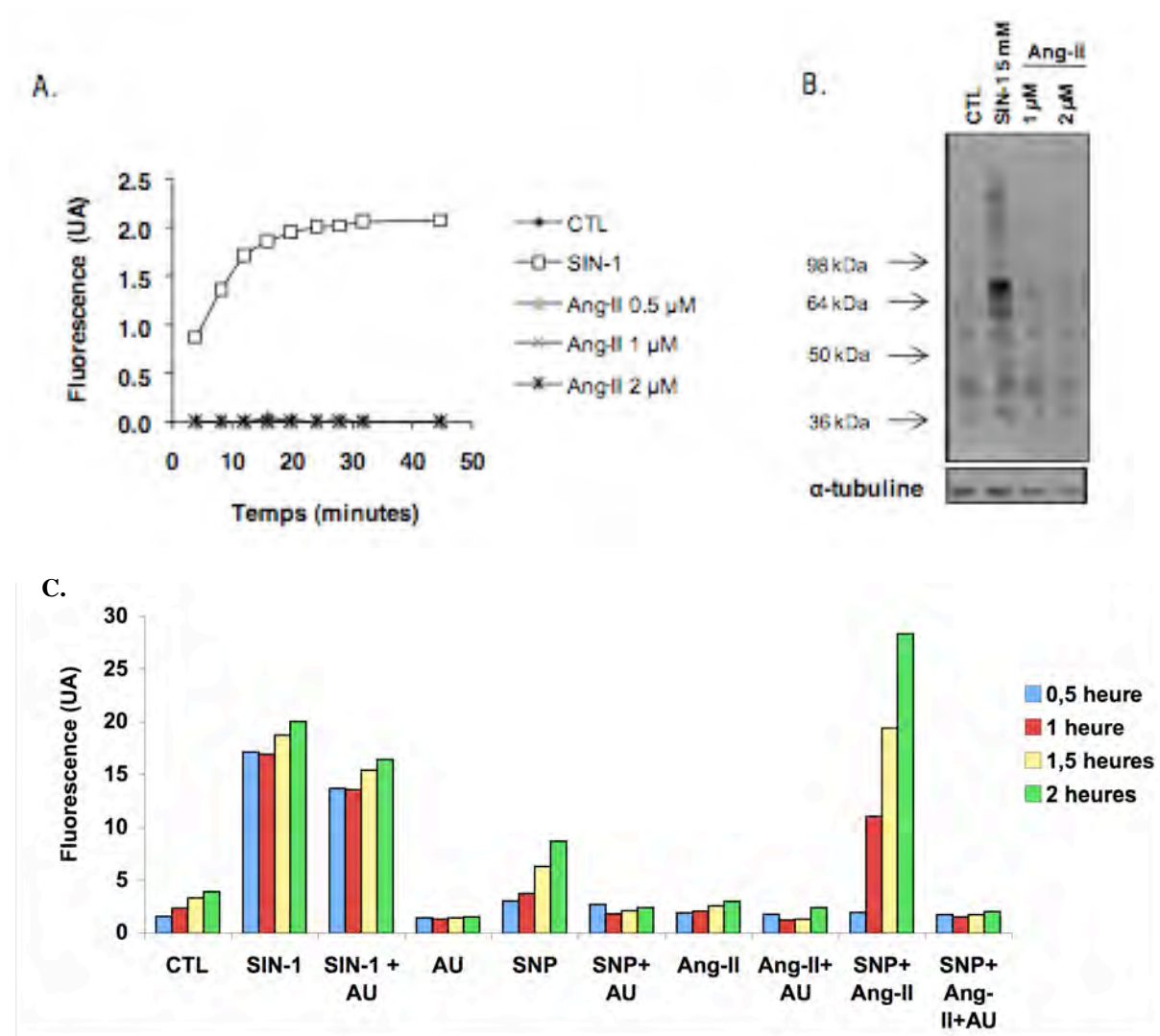
Nous avons eu recours à la sonde HPF afin de détecter la formation **directe** de peroxynitrite. Les HUVECs ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits, incubées en présence de la sonde HPF pendant 40 minutes et stimulées en présence d'Ang-II (0,5; 1 ou 2  $\mu$ M) pendant 4-45 minutes. Le SIN-1 (500  $\mu$ M) constitue le contrôle positif. Nous avons observé la même tendance (**Fig. III.12A**) que précédemment avec l'HCy (**Fig. III.6**) : la fluorescence n'est détectée que dans les cellules stimulées avec du SIN-1.

En conclusion, nous ne détectons pas la formation de peroxynitrite en présence d'Ang-II. Nous en déduisons que, soit la sonde HPF n'est pas assez sensible pour pouvoir détecter le peroxynitrite généré suite à une stimulation avec l'Ang-II, soit les temps de stimulation et la concentration en Ang-II ne sont pas adéquats pour induire une formation de peroxynitrite dans les HUVECs.

### *2.4.3. Mesure indirecte de la formation de peroxynitrite dans des cellules endothéliales stimulées avec l'Ang-II seule*

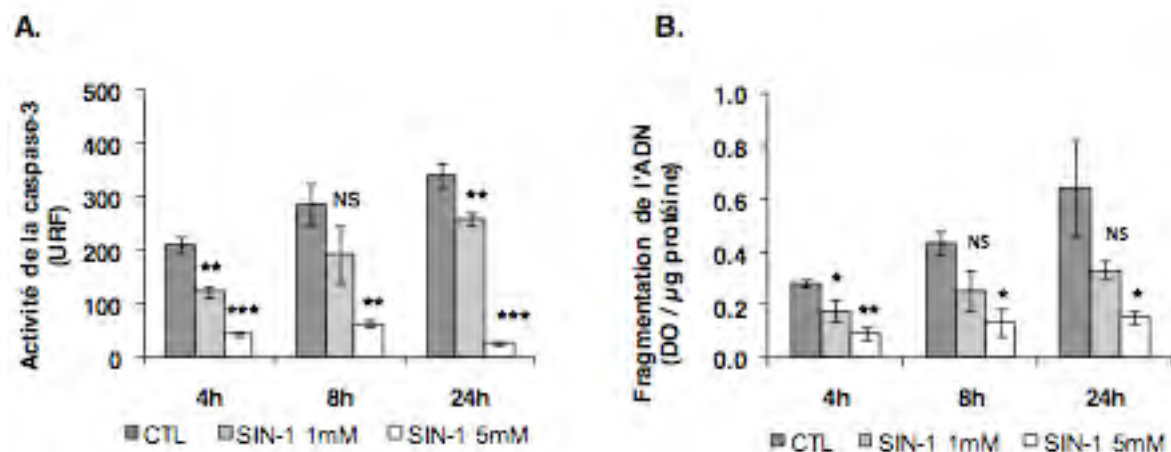
Nous avons étudié la formation de peroxynitrite via la détection de 3-NT par Western blot. Afin de favoriser le processus de nitration des protéines en présence d'Ang-II, nous avons augmenté la concentration en Ang-II, en travaillant à du 1  $\mu$ M au lieu de 100 nM. Les cellules ont été repiquées la veille de l'expérience en T25, mises au repos pendant 1 heure et stimulées pendant 22 heures en présence d'Ang-II (1 ou 2  $\mu$ M). Du SIN-1 (5 mM) est utilisé comme contrôle positif, à chaque temps de stimulation. Les cellules ont été lysées dans le tampon d'extraction TRIS-HCl. Sur le Western blot de la **Fig.III.12B**, nous constatons la formation de 3-NT, sous forme de *smears* (traînées), correspondant à l'ensemble des protéines ayant été nitrées. Cependant, ces 3-NT sont détectées dans les cellules stimulées avec le SIN-1, mais pas dans celles traitées avec l'Ang-II 1  $\mu$ M ou 2  $\mu$ M.

Sur base de nos résultats, nous remarquons que l'Ang-II ne permet pas la nitration des protéines, même à de fortes concentrations (1 ou 2  $\mu$ M). Cependant en parcourant la littérature, nous nous sommes rendus compte que les effets de l'Ang-II n'augmentent pas nécessairement avec la concentration. Par exemple, des chercheurs ont observé une variation de l'expression du gène *gp91-phox*, une des sous-unités de la NAD(P)H oxydase, après stimulation d'HUVECs avec 100 nM d'Ang-II (Rueckschloss, Quinn et al. 2002). Cependant, cette expression de *gp91-phox* n'était plus induite en présence de 1  $\mu$ M d'Ang-II. A l'inverse, d'autres auteurs travaillant sur des cellules EAhy926 ont constaté un effet plus important de l'Ang-II sur l'expression de *PLGF* (placental growth factor), à une concentration de 1  $\mu$ M, comparé à du 100 nM (Pan, Fu et al. 2010). Les effets de l'Ang-II dépendent donc de la réponse cellulaire étudiée et selon la réponse analysée, les concentrations donnant les effets maximaux ne sont pas les mêmes.



**Figure III.12. Etude de l'effet de l'angiotensine-II sur la formation de peroxynitrite dans les cellules HUVECs en suivant l'oxydation de la sonde HPF (A) (C) ou la formation de 3-NT (B).** (A) Après incorporation de la sonde HPF pendant 40 minutes, les cellules ont été stimulées pendant 4-45 minutes avec de l'angiotensine-II (Ang-II) à 0,5  $\mu$ M; 1  $\mu$ M ou 2  $\mu$ M. Le SIN-1 (1 mM) constitue le contrôle positif. La formation de peroxynitrite est exprimée à partir des valeurs brutes. Le graphe représente la fluorescence à 520 nm émise par la sonde HPF, exprimée en unités arbitraires (UA) (n=1). (B) Analyse en Western blot à partir d'extraits totaux. Les HUVECs ont été stimulées pendant 22 heures avec de l'Ang-II à 1  $\mu$ M ou 2  $\mu$ M. Le SIN-1 (5 mM) constitue le contrôle positif. L'anticorps primaire anti-3NT a été dilué 1 :1.000 fois dans la solution de « blocking » contenant du TBS-t + 2 % de lait « Amersham » et mis à incuber en présence de la membrane, toute la nuit à 4 °C. L'anticorps secondaire a été dilué 1 :200.000 fois dans la solution de « blocking » et mis à incuber en présence de la membrane 1 heure à température ambiante. L' $\alpha$ -tubuline (55 kDa) est utilisée comme contrôle de charge. L'anticorps primaire a été dilué 1 :50.000 fois et mis à incuber en présence de la membrane 30 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire a été dilué 1 :200.000 fois et mis à incuber 30 minutes à température ambiante. La révélation s'est effectuée avec l'appareil photo Image Quant 350 (n=1).





**Figure III.13. Etude de l'effet protecteur du SIN-1 dans les cellules EAhy926 après une privation de sérum.** Les cellules ont été mises au repos pendant 36 heures et ensuite stimulées pendant 4, 8 ou 24 heures avec du SIN-1 à 1 mM ou 5 mM. L'apoptose est évaluée en mesurant l'activité caspase-3 (**A**) ou la fragmentation de l'ADN (**B**). L'activité de la caspase-3 est suivie en mesurant l'intensité de la fluorescence du fragment AFC libéré suite au clivage, par la caspase-3, du substrat Ac-DEVD-AFC. La fluorescence est exprimée en unités relatives de fluorescence (URF). (**B**) La fragmentation de l'ADN est exprimée comme le rapport entre l'ADN fragmenté et l'abondance en protéines. Les données représentent la moyenne de réplicats  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes. \*\*\*  $P < 0.001$  vs CTL; \*\*  $P < 0.01$  vs CTL; \*  $P < 0.05$  vs CTL; NS, pas de différence significative vs CTL.

### 2.4.4. Effets combinés de l'Ang-II et d'un donneur de NO

Afin de favoriser la formation de peroxynitrite par l'Ang-II, nous avons voulu faire une dernière expérience, en combinant l'Ang-II à un donneur de NO, le nitroprusside de sodium (SNP). En effet, en supposant que l'Ang-II active la NAD(P)H oxydase, générant des anions  $O_2^{\cdot-}$ , le temps de demi-vie du NO serait trop court pour réagir avec l' $O_2^{\cdot-}$  et ainsi former du peroxynitrite. En effet, Saito *et al.* ont stimulé des BAECs avec de l'Ang-II 100 nM et détecté une production de NO après seulement 1 minute (Saito, Hirata et al. 1996). La probabilité de réaction entre le NO et l'anion  $O_2^{\cdot-}$  est donc relativement faible. La présence d'Ang-II et d'un donneur de NO devrait donc favoriser la formation de peroxynitrite.

Les HUVECs ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits et mises en présence de la sonde HPF (détection de peroxynitrite), pendant 40 minutes. Les cellules ont ensuite été stimulées avec l'Ang-II (100 nM), en présence ou non du nitroprusside de sodium (SNP) (1 mM) pendant (0,5; 1; 1,5 ou 2 heures). Le SIN-1 (1 mM) constitue le contrôle positif. L'acide urique (AU) (2 mM) est utilisé comme *scavenger* spécifique du peroxynitrite. La **Figure III.12C** montre un effet de l'Ang-II sur les HUVECs, croissant en fonction du temps. De plus, nous observons un effet accru de l'Ang-II en présence du SNP, comparable à l'effet induit par le SIN-1. L'acide urique *scavenger* de peroxynitrite diminue cet effet, suggérant la formation de peroxynitrite dans la condition SNP + Ang-II. Néanmoins, nous ne parvenons pas à expliquer pourquoi, dans la condition SIN-1 + AU, nous ne constatons qu'une faible diminution de l'effet induit par le SIN-1 sur la formation de peroxynitrite dans cette expérience.

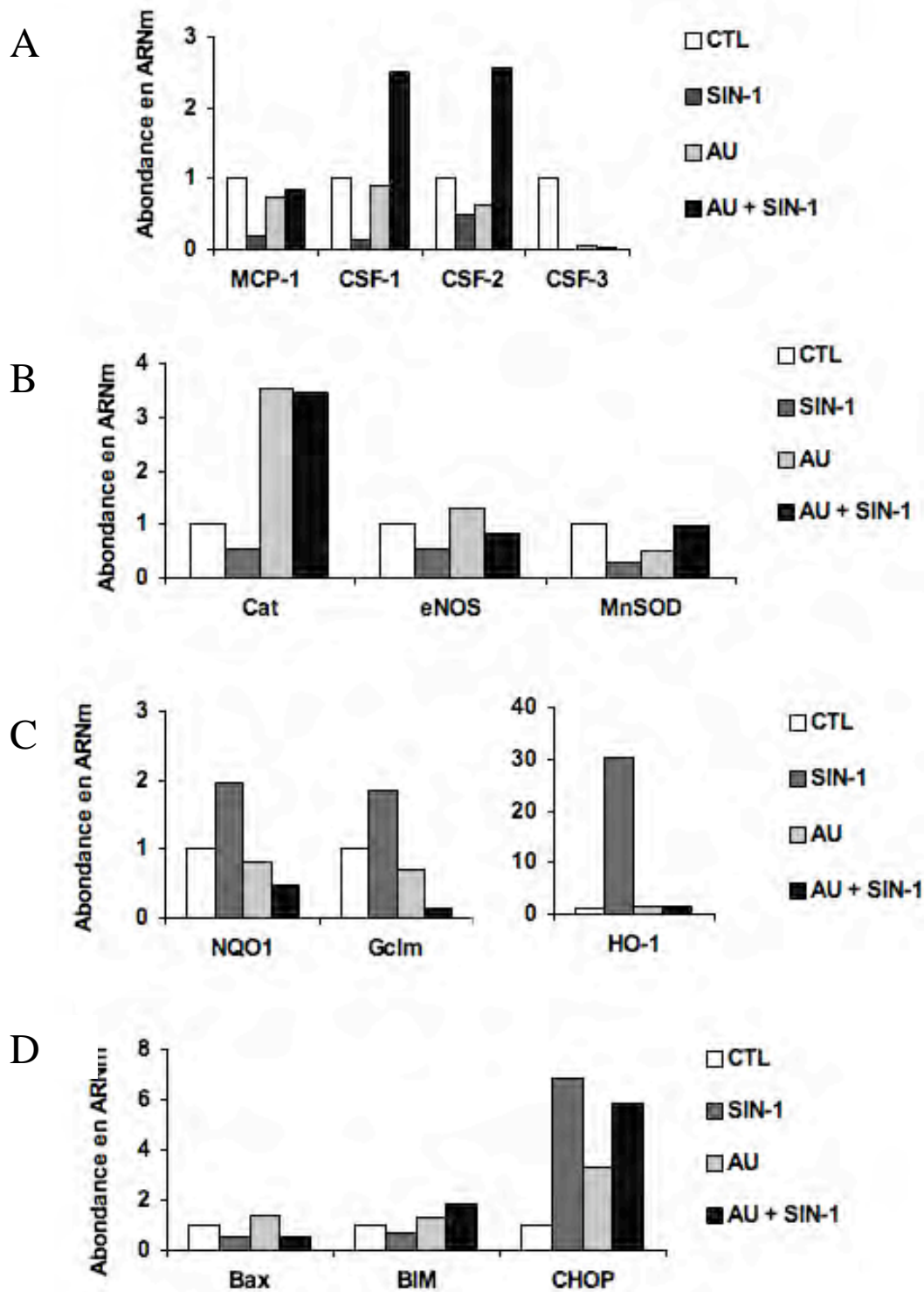
En conclusion de cette 2<sup>ème</sup> partie, nous avons échoué à mettre en place un système plus physiologique de formation de peroxynitrite, avec l'HCy, l'H/R ou les MoxLDLs. Quant aux résultats obtenus avec l'Ang-II, il semblerait que du peroxynitrite soit généré en présence d'Ang-II combinée au SNP. Cependant, il s'agit de données préliminaires. Dès lors, nous nous sommes refocalisés sur le système expérimental développé dans le cadre de la thèse de Laurine Mattart.

### 3. Etude de l'effet cytoprotecteur du peroxynitrite dans des cellules endothéliales

N'étant pas parvenus à mettre en place un modèle expérimental « plus physiologique » de formation de peroxynitrite dans des cellules endothéliales, nous avons poursuivi notre travail par l'étude du modèle expérimental utilisant le SIN-1, déjà caractérisé au sein de notre laboratoire (Mattart et al., soumis). En effet, le SIN-1 est décrit dans la littérature comme donneur artificiel de NO et d'anions  $O_2^{\cdot-}$ , générant du peroxynitrite (Mathy-Hartert, Mouithys-Mickalad et al. 2000).

#### 3.1. Effet cytoprotecteur du peroxynitrite suite à une privation en sérum dans des cellules endothéliales

Mattart *et al.*, ont démontré que le peroxynitrite protège les cellules endothéliales EAhy926 contre la mort cellulaire induite par une privation de sérum. Cette toxicité induite par l'absence de sérum a été étudiée en mesurant l'activité de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN (**Fig III.13**). Pour ce faire, les cellules ont été repiquées la veille de l'expérience en T25 et mises au repos pendant 36 heures (en absence de sérum). Ensuite, les cellules ont été stimulées pendant 4, 8 ou 24 heures avec du SIN-1 1 mM ou 5 mM.



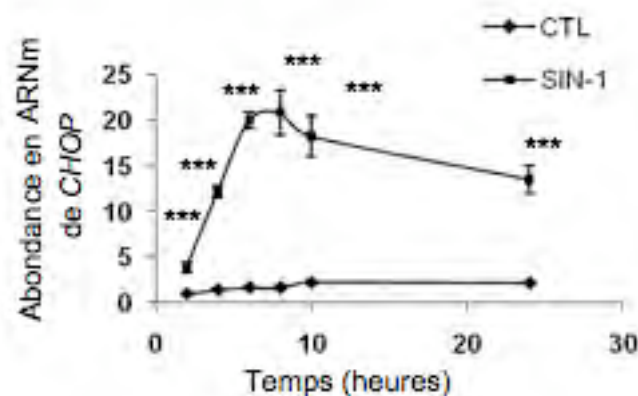
**Figure III.14. Etude de l'effet du peroxynitrite sur l'expression au niveau ARNm de gènes impliqués dans la fonction ou le dysfonctionnement endothélial.** Les graphes représentent l'abondance relative de l'ARNm de (A) *MCP-1*, *CSF-1*, *CSF-2* et *CSF-3*; (B) *Catalase* (*Cat*), *eNOS* et *MnSOD*; (C) *NQO1*, *Gclm* et *HO-1*; (D) *Bax*, *Bim* et *CHOP*. Les cellules EAhy926 ont été mises au repos pendant 36 heures et stimulées pendant 24 heures avec du SIN-1 à 5 mM. L'acide urique (AU) (5 mM) est utilisé comme *scavenger* de peroxynitrite. Analyse par carte microfluidique, en plaque de 384 puits Taqman Low Density Arrays. Le gène *PPIA* a été choisi comme gène de maintenance pour exprimer les niveaux d'induction relatifs. Les contrôles ont tous été rapportés à 1 (n=2).

Comme illustré à la **Figure III.13A**, nous observons une augmentation de l'activité de la caspase-3 en fonction du temps, ce qui suggère que la privation de sérum induit l'apoptose dans les cellules endothéliales. En présence de SIN-1 1 mM, l'activité caspase-3 est moins importante, tandis que nous ne détectons aucune augmentation de l'activité de la caspase-3 dans la condition SIN-1 5 mM. Les valeurs sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  l'erreur standard (SEM). Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel Sigmapstat (Systat Software, CA, USA) avec une ANOVA à 1 voie suivie d'un test de comparaison des moyennes de Holm-Sidak. Nous observons la même tendance pour la fragmentation de l'ADN en cellules EAhy926 (**Figure III.13B**): le SIN-1 contrecarre les effets toxiques de la privation de sérum. La formation de peroxynitrite induite par le SIN-1 exercerait donc un effet protecteur sur les cellules en favorisant leur survie.

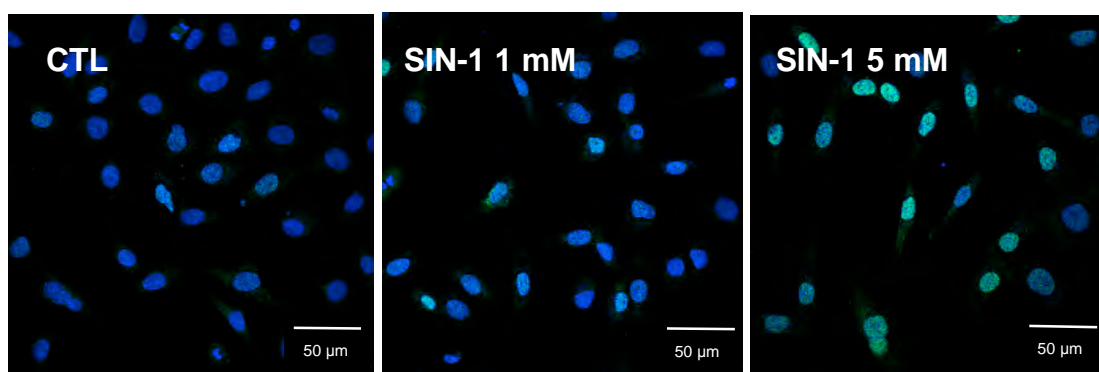
### 3.2. Effet du peroxynitrite sur l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans les fonctions de la cellule endothéliale – Analyse du profil d'expression en ARNm par cartes microfluidiques

Les cartes microfluidiques permettent l'étude des changements d'expression pour un ensemble de gènes différents (96 dans notre cas). Ces gènes ont été sélectionnés parce qu'ils sont décrits pour jouer un rôle dans la (dys)fonction endothéliale (**Annexe 1**). L'analyse par cartes microfluidiques constitue un outil complémentaire pour décortiquer les mécanismes moléculaires de cet effet cytoprotecteur induit par le peroxynitrite. Pour ce faire, les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en T25, mises au repos pendant 36 heures et stimulées pendant 24 heures en présence de SIN-1 5 mM. L'acide urique (AU) (5 mM) est utilisé comme *scavenger* de peroxynitrite. L'analyse par cartes microfluidiques a montré que le peroxynitrite modifiait le niveau d'expression de plusieurs gènes (**Fig. III.14**). D'une part, nous observons une diminution de l'expression en ARNm de près de 0,5 fois voire 0,75 fois pour certains gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bim) ou des protéines antioxydantes (catalase, MnSOD). Nous constatons également une diminution de l'expression en ARNm de 0,5 fois pour la eNOS et d'environ 0,75 fois pour des gènes codant pour des protéines pro-athérogènes (MCP-1, CSF 1-3). D'autre part, nous avons constaté une augmentation de l'expression en ARNm pour d'autres gènes. Parmi eux, une augmentation de 2 à 30 fois pour des gènes cibles de la voie Nrf2 (NQO1, GCLM, hmox-1), par rapport au contrôle. De même, nous constatons une augmentation d'expression de 5 fois, par rapport au contrôle, pour un gène codant pour un facteur de transcription impliqué dans la voie UPR et engendrant une réponse apoptotique (CHOP). Nous avons également observé une augmentation de l'expression en ARNm de gènes codant pour d'autres facteurs de transcription (CEPB, FOS) (résultats non montrés). Les effets de l'acide urique sont parfois surprenants : seul il n'influence généralement pas l'expression des gènes étudiés, sauf pour le gène codant la catalase qui est induit. Il empêche bien les surexpressions Nrf2-dépendantes (gènes codant NQO1, GCLM, HO-1), mais nous n'avons pas d'explications pour les effets observés sur l'expression des CSF-1 et 2, lorsqu'il est combiné au SIN-1.

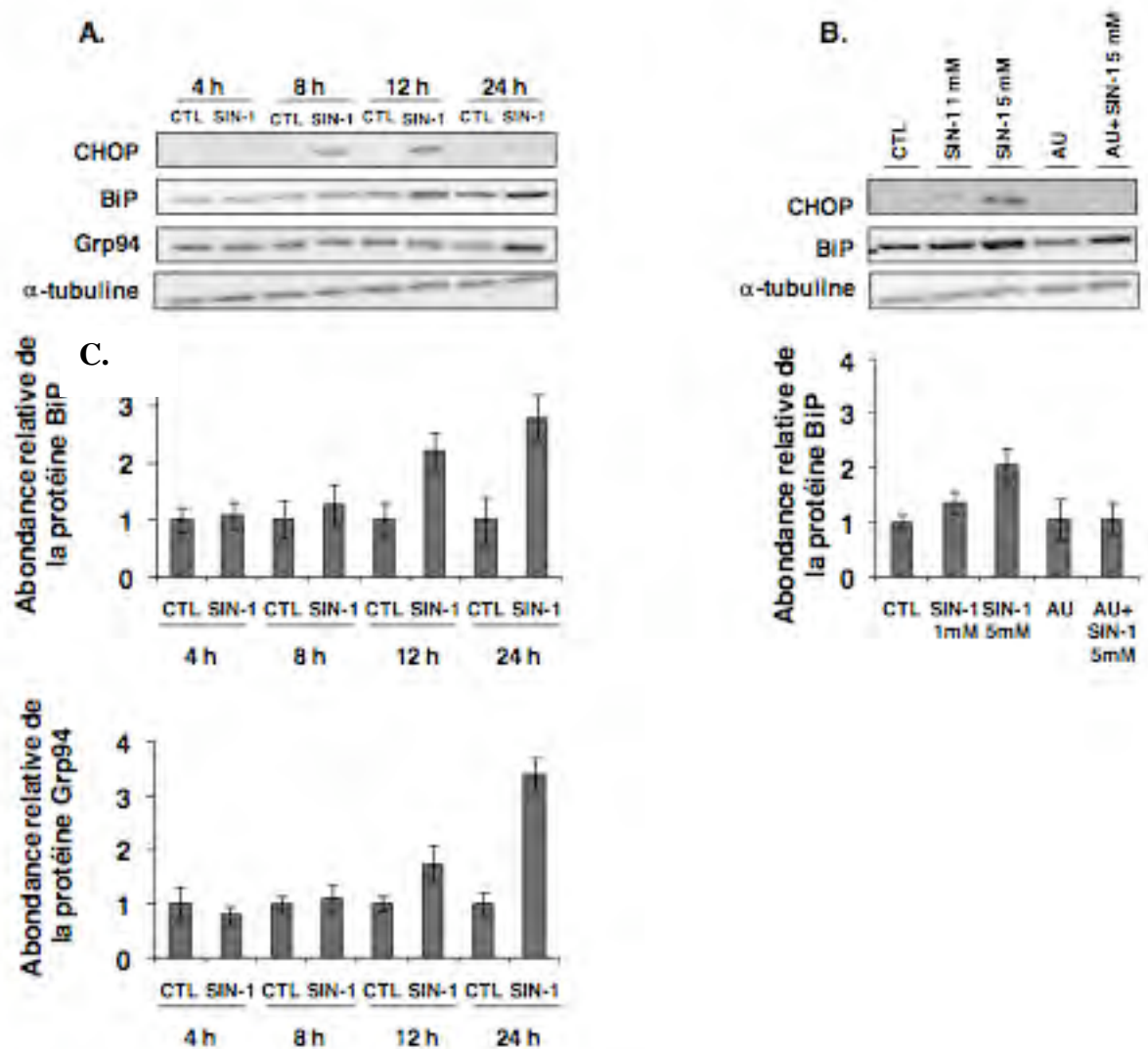
De manière intéressante, les résultats ont montré une induction non négligeable de l'expression en ARNm du gène *CHOP*, généralement connu pour jouer un rôle pro-apoptotique dans la cellule. Toutefois, certains articles ont montré récemment que CHOP pouvait, dans certains cas, exercer un effet plutôt anti-apoptotique (Mayerhofer and Kodym 2003). Dans la dernière partie de ce mémoire, nous nous sommes donc intéressés à l'expression de ce facteur de transcription et à son rôle éventuel dans l'effet protecteur induit par le peroxynitrite.



**Figure III.15. Etude de l'effet du SIN-1 sur l'expression au niveau ARNm de *CHOP* dans les cellules EAhy926.** Le graphe représente l'abondance relative de l'ARNm de *CHOP* en fonction du temps après une mise au repos de 36 heures et une incubation de 2, 4, 6, 8, 10 ou 24 heures en présence de SIN-1 5 mM. Analyse par RT-PCR en temps réel. Le gène *RPL13A* a été choisi comme gène de maintenance pour exprimer les niveaux d'induction relatifs. Les résultats sont rapportés au contrôle 2 heures fixé à 1. Les données représentent la moyenne de réplicats  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes. \*\*\*  $P < 0.001$  vs CTL



**Figure III.16. Etude de l'effet du SIN-1 sur la localisation subcellulaire de *CHOP*.** Nous avons suivi la translocation nucléaire du facteur de transcription *CHOP* dans les cellules EAhy926 suite à une incubation de 36 heures sans sérum et une stimulation de 24 heures en présence de SIN-1 1 mM ou 5 mM. La translocation nucléaire de *CHOP* est révélée par immunocytochimie via l'utilisation d'un anticorps primaire anti-*CHOP* de souris et d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à un Alexa 488 nm. La visualisation se fait en microscopie confocale à l'aide de l'objectif 63 X (n=3).



**Figure III.17. Etude de l'effet du SIN-1 sur la voie UPR.** Analyse en Western blot de CHOP, Grp94 et BiP à partir d'extraits cytosoliques. Les cellules EAhy926 ont été incubées 36 heures sans sérum et ensuite stimulées (A) pendant 4, 8, 12 ou 24 heures avec du SIN-1 à 5 mM ou (B) pendant 12 heures avec du SIN-1 à 1 mM ou 5 mM en présence d'acide urique (AU) (5 mM) ou non. L'anticorps primaire anti-CHOP (30 kDa) a été dilué 1 :1.000 fois dans la solution de « blocking » contenant du TBS-t + 2 % de lait « Amersham » et mis à incuber en présence de la membrane, toute la nuit à 4°C. Les anticorps primaires anti-Grp94 (94 kDa) ou anti-BiP (78 kDa) ont été dilués 1 :2.500 fois dans la solution de « blocking » contenant du TBS-t + 2 % de lait « Amersham » et mis à incuber en présence de la membrane 2 heures à température ambiante. L'α-tubuline (55 kDa) sert de contrôle de charge. L'anticorps primaire a été dilué 1 :50.000 et mis à incuber en présence de la membrane 30 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire a été dilué 1 :200.000 fois dans la solution de « blocking » et mis à incuber en présence de la membrane 1 heure à température ambiante. La quantification représente la moyenne de triplicats ± SEM de 3 Western blots indépendants. (C) Analyse quantitative des Western blots illustrés en (A) et en (B).

### 3.3. Etude de l'expression de CHOP au niveau ARNm et protéine dans des cellules endothéliales stimulées avec le SIN-1

Lors d'un stress du RE, il y a activation de la voie UPR afin de pallier une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, d'arrêter la synthèse des protéines et d'augmenter l'abondance en protéines chaperonnes pour gérer ce stress. Cependant, suite à un stress trop intense du RE, l'activation de la voie UPR peut induire l'apoptose de la cellule notamment par l'expression de la protéine CHOP (Kim, Emi et al. 2006). Or, les résultats obtenus après analyse par cartes microfluidiques (**Fig. III.14**), montrent une surexpression de CHOP induite par le SIN-1 5 mM, alors que dans ces mêmes conditions l'apoptose des cellules diminue (**Fig. III.13**). Nous avons donc émis l'hypothèse que dans nos conditions, CHOP pourrait jouer un rôle plutôt anti-apoptotique. Nous avons donc approfondi nos recherches en étudiant l'induction de CHOP par le peroxytnitrite, tant au niveau ARNm que protéique.

#### 3.3.1. Etude de l'induction de CHOP aux niveaux ARNm et protéine en présence de SIN-1

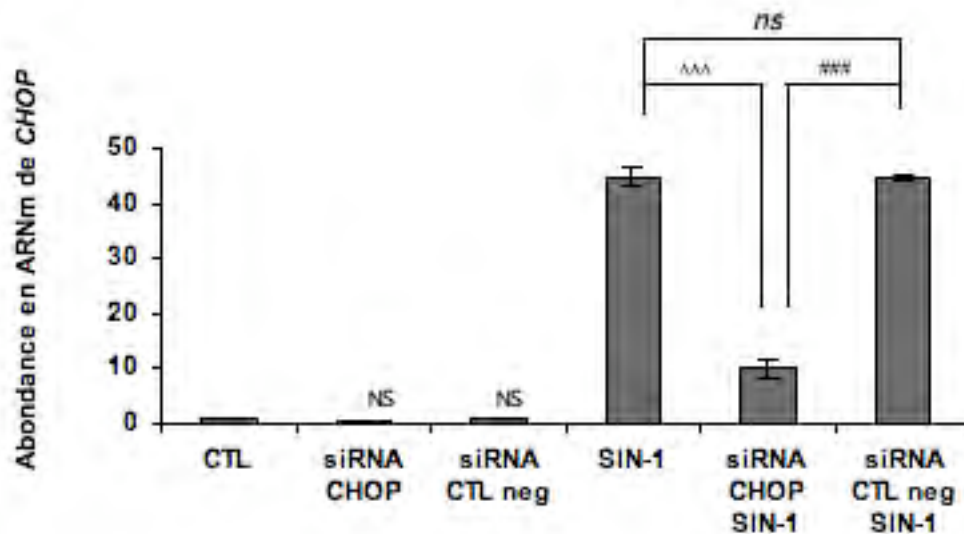
Le peroxytnitrite est connu pour activer la voie UPR (Dickhout, Hossain et al. 2005). Au cours de cette expérience, nous avons voulu suivre l'expression en ARNm *CHOP* au cours du temps, après stimulation des cellules en présence de SIN-1. Pour ce faire, les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en T25, mises au repos pendant 36 heures et stimulées pendant 2, 4, 6, 8, 10 ou 24 heures avec du SIN-1 (5 mM). Ensuite, nous avons procédé à l'extraction d'ARN, suivie d'une rétrotranscription et d'une analyse de l'expression en ARNm par PCR en temps réel. Nous avons observé une induction de l'expression en ARNm du gène *CHOP* dès 2 heures, laquelle atteint un pic après 6 heures et diminue après 24 heures de stimulation en présence de SIN-1 (**Fig. III.15**). Les valeurs sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  l'erreur standard (SEM). Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel Sigmapstat (Systat Software, CA, USA) avec une ANOVA à 1 voie suivie d'un test de comparaison des moyennes de Holm-Sidak.

Après avoir observé une induction de l'expression en ARNm de *CHOP*, nous avons suivi son expression au niveau protéique, par immunocytochimie (IC) (**Fig. III.16**) et par Western blot (**Fig. III.17**).

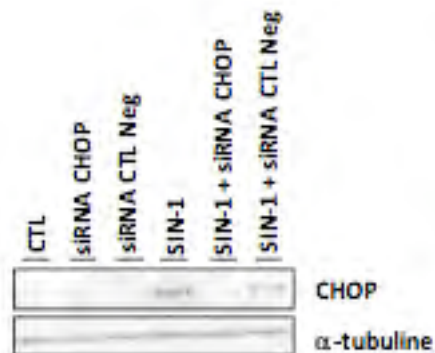
Dans un premier temps, la translocation nucléaire de la protéine *CHOP* a été mise en évidence par IC. Les cellules ont été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits sur lames couvre-objet, mises au repos pendant 36 heures et stimulées pendant 24 heures avec du SIN-1 (1 ou 5 mM). Les cellules ont ensuite été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) puis marquées avec un anticorps anti-*CHOP*. Nous avons constaté une translocation nucléaire de la protéine CHOP dans les cellules stimulées avec le de SIN-1 5 mM, mais pas avec le SIN-1 1 mM (**Fig. III.16**). Ces résultats suggèrent que le SIN-1 induit l'activation du facteur de transcription *CHOP*. Cependant, l'absence d'une condition acide urique ne nous permet pas d'affirmer que c'est bien le peroxytnitrite formé à partir de SIN-1 qui induit cet effet.

Dans un second temps, nous avons suivi l'abondance de la protéine CHOP par Western blot, dans ces mêmes conditions de stimulation. Sachant que l'activation de la voie UPR induit l'expression des gènes codant BiP et Grp94, nous avons aussi étudié leur abondance protéique par Western blot. Nous avons observé une augmentation de l'abondance de CHOP après 8 heures et 12 heures de stimulation au SIN-1 (**Fig. III.17**). Par ailleurs, nous





**Figure III.18. Etude de l'effet des siRNA anti-CHOP sur l'abondance de l'ARNm de CHOP.** Les cellules EAhy926 ont été transfectées ou non, pendant 24 heures avec des siRNA anti-CHOP à 5 nM ou des siRNA servant de contrôle négatif (CTL Neg). Ensuite, les cellules ont été stimulées ou non, pendant 6 heures avec du SIN-1 à 5 mM. Analyse par RT-PCR en temps réel. Le gène *RPL13A* a été choisi comme gène de maintenance pour exprimer les niveaux d'induction relatifs. Le contrôle a été rapporté à 1. Les données représentent la moyenne de réplicats  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes. \*\*\*  $P < 0.001$  vs CTL; NS, pas de différence significative vs CTL; ΔΔΔ  $P < 0.001$  siRNA CHOP SIN-1 vs SIN-1; ###  $P < 0.001$  siRNA CTL Neg vs SIN-1; ns, pas de différence significative siRNA CTL Neg SIN-1 vs SIN-1.



**Figure III.19. Etude de l'effet des siRNA anti-CHOP sur l'abondance de la protéine CHOP.** Les cellules EAhy926 ont été transfectées ou non, pendant 24 heures avec des siRNA anti-CHOP à 5 nM ou des siRNA servant de contrôle négatif (CTL Neg). Ensuite, les cellules ont été stimulées ou non, pendant 8 heures avec du SIN-1 à 5 mM. L'anticorps primaire anti-CHOP (30 kDa) a été dilué 1 :1.000 fois dans la solution de « blocking » contenant du TBS-t + 2 % de lait « Amersham » et mis à incuber en présence de la membrane, toute la nuit à 4°C. L'α-tubuline (55 kDa) sert de contrôle de charge. L'anticorps primaire a été dilué 1 :50.000 et mis à incuber en présence de la membrane 30 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire a été dilué 1 :200.000 fois dans la solution de « blocking » et mis à incuber en présence de la membrane 1 heure à température ambiante. La révélation s'est effectuée avec l'appareil photo Image Quant 350 (n=2).



constatons une augmentation de l'abondance en protéine BiP de 1; 2 ou  $\pm 2,7$  fois après 8, 12 ou 24 heures de stimulation au SIN-1, respectivement. De même, nous observons une augmentation de l'abondance en protéine Grp94 de  $\pm 1,7$  fois après 12 heures et de  $\pm 3,2$  fois après 24 heures de stimulation avec du SIN-1, respectivement.

En conclusion, nous constatons une activation de la voie UPR induite par le peroxy-nitrite, mise en évidence par l'induction de BiP, Grp94 et CHOP, trois marqueurs reconnus de la voie UPR.

### *3.3.2. Etude de l'invalidation de CHOP dans des cellules endothéliales stimulées avec du SIN-1*

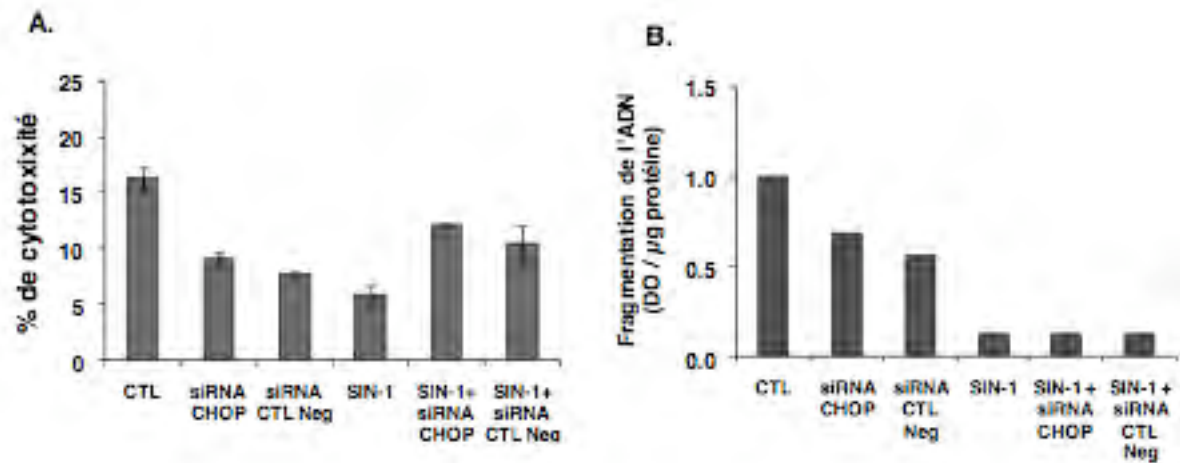
Comme décrit au point 3.1., le peroxy-nitrite exerce un effet bénéfique en protégeant les cellules contre la toxicité induite par l'absence de sérum. Afin de déterminer l'implication de la protéine CHOP dans cet effet bénéfique, nous avons invalidé CHOP par siRNA. Les cellules EAhy926 ont été repiquées la veille de l'expérience en T25, transfectées avec des siRNA anti-CHOP (5 nM), pendant 24 heures et enfin stimulées ou non, pendant 6 heures en présence de SIN-1 (5 mM). Après stimulation, nous avons procédé à l'extraction d'ARN, suivi d'une rétrotranscription et d'une analyse de l'expression en ARNm par RT-PCR en temps réel.

CHOP n'étant pas induit dans les conditions contrôle, nous n'observons clairement l'effet des siRNA anti-CHOP que dans les cellules stimulées avec du SIN-1 5 mM (**Fig. III.18**). Les valeurs sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  l'erreur standard (SEM). Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel Sigmapstat (Systat Software, CA, USA) avec une ANOVA à 1 voie suivie d'un test de comparaison des moyennes de Holm-Sidak. Nous remarquons une diminution de l'expression du gène CHOP, de 4,5 fois dans la condition siRNA anti-CHOP + SIN-1, comparé à la condition SIN-1 seul, alors que les siRNA utilisés comme contrôle négatif n'ont aucun effet.

Après avoir constaté une diminution importante de l'abondance en ARNm de CHOP en présence des siRNA anti-CHOP, nous avons confirmé cette invalidation au niveau protéique. Les cellules ont été repiquées la veille de l'expérience en T25 avant l'expérience, transfectées, pendant 24 heures et stimulées ou non, pendant 4, 8, 12 et 24 heures en présence de SIN-1 (5 mM) (**Fig. III.19**). Nos résultats nous indiquent que CHOP n'est pas induit ni dans la condition contrôle, ni dans les cellules transfectées non stimulées. Cependant, nous observons une belle augmentation de l'abondance de la protéine CHOP dans la condition SIN-1, laquelle est absente dans les cellules transfectées avec des siRNA anti-CHOP et stimulées avec du SIN-1. L'induction de CHOP est bien observée dans les cellules transfectées avec des siRNA servant de contrôle négatif et stimulées

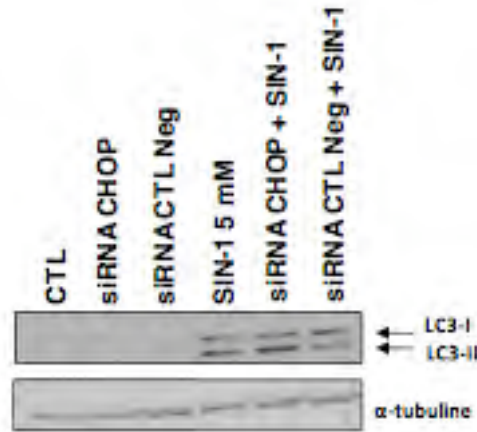
### *3.3.3. Effet protecteur du peroxy-nitrite : implication de CHOP ?*

Nous avons voulu mettre en évidence un éventuel effet protecteur dû à l'induction de CHOP. Pour ce faire, nous avons évalué les conséquences de l'invalidation avec le siRNA anti-CHOP sur la mortalité cellulaire, à l'aide de tests de relargage de la lactate déshydrogénase (LDH) et de fragmentation de l'ADN. Pour le test LDH, les cellules EAhy926 ont donc été repiquées la veille de l'expérience en plaque 24 puits et transfectées pendant 24 heures avec les siRNA anti-CHOP (5 nM). Ensuite, les cellules ont été stimulées, ou non, pendant 24 heures en présence de SIN-1 (500  $\mu$ M). Les résultats obtenus confirment

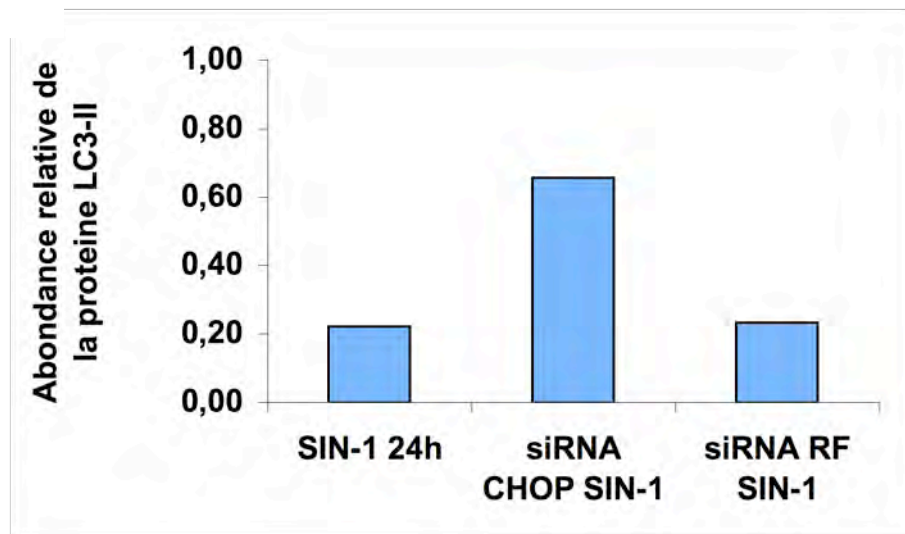


**Figure III.20. Etude de l'effet de l'invalidation de CHOP sur la survie cellulaire.** Les cellules EAhy926 ont été transfectées, ou non, pendant 24 heures avec des siRNA anti-CHOP à 5 nM ou des siRNA servant de contrôle négatif (CTL Neg). Ensuite, les cellules ont été stimulées ou non, pendant 24 heures avec du SIN-1 à 5 mM. **(A)** La cytotoxicité est évaluée par la mesure de l'activité de la lactate deshydrogénase. **(B)** L'apoptose est évaluée en mesurant la fragmentation de l'ADN, exprimée comme le rapport entre l'ADN fragmenté et l'abondance en protéines (n=2).

A.



B.



**Figure III.21. Etude de l'effet de l'invalidation de CHOP sur la formation d'autophagosomes.** (A) Les cellules EAhy926 ont été transfectées ou non, pendant 24 heures avec des siRNA anti-CHOP à 5 nM ou des siRNA servant de contrôle négatif (CTL Neg). Ensuite, les cellules ont été stimulées ou non, pendant 24 heures avec du SIN-1 à 5 mM. Les anticorps anti-LC3 (LC3-I 16 et LC3-II 14 kDa) ont été dilués 1 :2.500 fois dans la solution de « blocking » contenant du TBS-t + 2 % de lait « Amersham » et mis à incuber en présence de la membrane, toute la nuit à 4°C. L'α-tubuline (55 kDa) sert de contrôle de charge. L'anticorps primaire a été dilué 1 :50.000 et mis à incuber en présence de la membrane 30 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire a été dilué 1 :200.000 fois dans la solution de « blocking » et mis à incuber en présence de la membrane 1 heure à température ambiante. La révélation s'est effectuée avec l'appareil photo Image Quant 350 (n=1). (B) Analyse quantitative du Western blot illustré en (A).

# IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

## IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conditions inflammatoires, le  $\text{NO}^\bullet$  et l'anion  $\text{O}_2^{\bullet-}$  sont produits en forte concentration, provoquant la formation de peroxynitrite. Dans la littérature, le peroxynitrite est essentiellement décrit comme étant cytotoxique, induisant la mort cellulaire (apoptose, nécrose), favorisant les dommages cellulaires et/ou tissulaires. Il est également décrit que sa génération augmente, en cas de déficience des mécanismes de détoxification et quand la production simultanée le  $\text{NO}^\bullet$  et  $\text{O}_2^{\bullet-}$  augmente, condition qui est associée aux facteurs de risques cardiovasculaires. Le peroxynitrite est une molécule hautement réactionnelle à la fois toxique et bénéfique pour la cellule, selon les concentrations en présence. En effet, il peut entraîner d'une part de multiples dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines. Au-delà de 20  $\mu\text{M}$ , le peroxynitrite induit le dysfonctionnement endothélial *in vivo* (Nossuli, Hayward et al. 1998). D'autre part, il peut favoriser la survie cellulaire, en activant des voies cytoprotectrices telles les voies Nrf2 et UPR. En effet, en conditions physiologiques, le peroxynitrite est présent en faibles concentrations et agit en tant que messenger secondaire, notamment impliqué dans la vasodilatation des cellules musculaires lisses, en augmentant la concentration en GMPc (Mayer, Schrammel et al. 1995). Lors d'un stress du RE, il y a activation de la voie UPR. Cependant, en cas de stress trop intense, la voie UPR peut déclencher l'apoptose notamment médiée par *CHOP*. Dans la littérature, le peroxynitrite est décrit comme impliqué dans le dysfonctionnement endothélial, à la base du développement des maladies cardiovasculaires, telle l'athérosclérose. Néanmoins, ses effets cytoprotecteurs sont nettement moins bien décrits. L'étude du peroxynitrite et de ses effets au niveau cellulaire fait donc l'objet de recherches prometteuses dans le cadre de la prévention et de la lutte contre les maladies cardiovasculaires.

**Lors de la première partie de ce mémoire et afin de travailler dans des conditions plus proches de celles retrouvées *in vivo*, nous avons tout d'abord testé plusieurs systèmes plus physiologiques de génération de peroxynitrite.** Sur base de la littérature, nous avons donc eu recours à l'HCy, l'H/R, les MoxLDLs et l'Ang-II qui nous semblaient les plus pertinents dans le contexte du dysfonctionnement endothélial.

L'HCy, dérivée du métabolisme des purines, est une molécule décrite comme induisant la formation de ROS par auto-oxydation (Yang, Huang et al. 2005). En plus, elle est décrite pour diminuer les défenses antioxydantes (Lentz and Haynes 2004). Nous nous sommes tout d'abord assurés que l'HCy était biologiquement active, en étudiant l'abondance de BiP par Western blot (**Figure III.3.**). En effet, il a été montré que l'HCy (3 mM) était capable d'induire une réponse UPR et l'expression de la protéine BiP dans des HUVECs (Zhang, Cai et al. 2001). Nous avons stimulé les cellules EAhy926 avec de l'HCy (1 ou 5 mM). Nous avons constaté par Western blot, une augmentation d'abondance de BiP dans la condition 5 mM, suggérant que l'HCy était bien bioactive dans notre modèle. Par ailleurs, l'HCy a également été décrite pour activer la voie Nrf2 et induire la surexpression de *hmx-1*, un des gènes cibles de la voie Nrf2. En effet, à une concentration de 50  $\mu\text{M}$ , l'HCy est responsable d'une accumulation nucléaire de Nrf2 dans les macrophages murins RAW267.4 (Bea, Hudson et al. 2009). Il a également été montré que l'HCy (3 mM) pouvait induire une augmentation d'abondance de la protéine HO-1 dans des cellules musculaires lisses (Liu, Peyton et al. 2005). Cependant, dans les cellules endothéliales EAhy926 stimulées avec de l'HCy (1 ou 5 mM), nous n'avons pas observé de translocation nucléaire de Nrf2 (**Figure III.4.**), ni d'augmentation en ARNm de *hmx-1* (**Figure III.5.**). Nous pensons que les effets de l'HCy varient en fonction du type cellulaire. Nous n'avons pas non plus détecté la formation de peroxynitrite dans des cellules stimulées avec l'HCy, ni par une approche directe

utilisant la sonde HPF, (**Figure III.6.**), ni par une approche indirecte via la mise en évidence de 3-NT par Western blot, après stimulation de cellules endothéliales EAhy926 ou HUVECs avec de l'HCy (3 ou 5 mM) (**Figure III.7.**). Zhang *et al.* avaient quant à eux observé la formation de 3-NT par Western blot dans des HUVECs stimulées avec de l'HCy (50  $\mu$ M), mais après avoir concentré leurs échantillons par immunoprécipitation avec des anticorps anti-3-NT (Zhang, Li et al. 2000). C'est pourquoi nous avons procédé à l'analyse de 3-NT par Western blot, après une immunoprécipitation anti-3-NT (résultats non montrés). Malheureusement nous n'avons pas obtenu de résultats interprétables pour cette expérience. N'ayant rien détecté dans notre contrôle positif, nous pensons que cet échec pourrait être dû aux anticorps ou aux billes utilisés qui étaient stockés depuis longtemps au congélateur. Le protocole d'immunoprécipitation utilisé ici pourrait certainement être amélioré grâce à certaines mises au point. Bien qu'utilisées par (Zhang, Cai et al. 2001), les concentrations en HCy utilisées sont néanmoins très élevées, même si l'exposition des cellules à l'HCy reste limitée dans le temps. En effet, rappelons qu'une HHcy sévère correspond approximativement à 100-500  $\mu$ M (Cheng, Yang et al. 2009). Des concentrations en HCy de 3 ou 5 mM dépassent donc largement celles retrouvées en conditions pathophysiologiques. Vu que les concentrations en HCy pour lesquelles nous avons obtenu un effet étaient non physiologiques, nous avons abandonné l'HCy.

Dans la littérature, l'H/R, mimant l'I/R *in vitro*, est connue pour induire la formation de ROS dans des cardiomyocytes de rat (Wang, Zhang et al. 2006). En vue de confirmer l'efficacité de notre système d'H/R mis en place, nous avons d'abord suivi la translocation nucléaire du facteur HIF-1 $\alpha$ , considéré comme marqueur de l'hypoxie, par immunocytochimie (**Figure III.8.**). Après avoir constaté cette translocation nucléaire de HIF-1  $\alpha$ , nous avons ensuite appliqué ce système d'H/R à des cellules EAhy926 ou HUVECs sur base de la longue expérience de l'équipe de Carine Michiels dans ce domaine. Malheureusement, nous n'avons détecté aucune formation de ROS ou de peroxy-nitrite dans ces conditions (**Figure III.9.**). Nous supposons que nous ne sommes pas parvenus à identifier les conditions de cinétique d'hypoxie et réoxygénation optimales pour les modèles de cellules endothéliales utilisées dans ce mémoire.

Suite à cela, nous avons testé l'effet des LDLs oxydées, et plus particulièrement des MoxLDLs, sur la formation de peroxy-nitrite dans des cellules endothéliales. En effet, il a été montré que les LDLs oxydées induisaient la formation de ROS dans des macrophages murins RAW264.7., de manière plus importante encore avec les MoxLDLs (Calay, Rousseau et al. 2010). De plus, les MoxLDLs induisent également un stress oxydatif dans des cellules endothéliales EAhy926, contrairement aux OxLDLs (mémoire de Ledovina Alaimo, 2010-2011). Ainsi, en utilisant la sonde H<sub>2</sub>DCFDA, nous observons bien une production de ROS dans des cellules EAhy926 stimulées avec les MoxLDL (**Figure III.10A**), mais pas avec la sonde plus spécifique pour le peroxy-nitrite, sauf dans la condition SIN-1 (**Figure III.10B**). De nouveau, la sensibilité de la sonde HPF après stimulation avec des MoxLDLs pourrait être remise en question. En effet, nous pensons que soit les MoxLDLs ne génèrent pas de peroxy-nitrite, soit elles en génèrent de trop faibles quantités dès lors non détectables par la sonde HPF. Il faut d'ailleurs signaler que dans la plupart des articles de la littérature, les chercheurs utilisent la sonde H<sub>2</sub>DCFDA en présence ou non d'acide urique pour évaluer la formation de peroxy-nitrite.

Enfin, nous avons eu recours à l'Ang-II, également décrite comme induisant la production de ROS, en stimulant la NAD(P)H oxydase (Seshiah, Weber et al. 2002). Tout comme pour l'HCy, nous avons vérifié que l'Ang-II était bien biologiquement active. Pour ce

faire, nous avons incubé des cellules EAhy926 et HUVECs avec de l'Ang-II (100 nM). Nous avons choisi une concentration en Ang-II de 100 nM, sur base de différents articles travaillant sur HUVECs avec cette concentration (Yamagishi, Nakamura et al. 2005; Ko, Lee et al. 2007). Nous avons constaté que l'Ang-II (100 nM) induit une surexpression de 1,6 fois de l'ARNm de *MCP-1* dans les HUVECs (**Figure III.11B**) (Yamagishi, Nakamura et al. 2005), mais pas dans les cellules EAhy926 (**Figure III.11A**). Les HUVECs répondent donc bien à l'Ang-II. Pour les cellules endothéliales EAhy926, les choses semblent beaucoup moins claires, celles-ci pouvant soit être dépourvues du récepteur à l'Ang-II, soit l'avoir « perdu » (sélection de clones) (voir point 2.4.1.). Nous avons donc testé la formation de peroxynitrite avec la sonde HPF dans des HUVECs en présence d'Ang-II (0,5 ; 1 ou 2  $\mu$ M), sans succès (**Figure III.12A**). Par la suite, nous avons également tenté d'étudier la formation de 3-NT dans des HUVECs stimulées avec de l'Ang-II (1 ou 2  $\mu$ M) (**Figure III.12B**). Malheureusement, nous observions la présence de 3-NT uniquement dans notre contrôle positif (SIN-1).

Pourtant, l'Ang-II (100 nM) est décrite dans la littérature pour générer des anions  $O_2^{\cdot -}$  dans des HUVECs après 30-60 minutes ou 6 heures de stimulation ainsi que dans des BAECs après 7-18 heures de stimulation (Zhang, Schmeisser et al. 1999; Sohn, Raff et al. 2000). Il a été montré que l'Ang-II induit également la production de  $NO^{\cdot}$  (Thorup, Kornfeld et al. 1998), générant du peroxynitrite (Pueyo, Arnal et al. 1998). En effet, certains auteurs ont constaté que la formation de ROS induite par l'Ang-II (100 nM), dans des cellules endothéliales d'aorte de rats, diminuait en présence de SOD ou de L-NMMA, un inhibiteur de NOS (Pueyo, Arnal et al. 1998). En outre, l'Ang-II (200 nM) induirait une diminution de la production de  $NO^{\cdot}$  de 50 % dans des BAECs. La formation de  $NO^{\cdot}$  est restaurée en présence de 100  $\mu$ M d'acide urique, suggérant qu'une formation de peroxynitrite est responsable de cette diminution (Doughan, Harrison et al. 2008). Toutefois, il semble plus difficile de reproduire ces résultats *in vitro*. En effet, Saito *et al.* ont constaté que des BAECs stimulées avec de l'Ang-II (100 nM) produisent du  $NO^{\cdot}$ , mais durant 1 minute seulement (Saito, Hirata et al. 1996). Cette production très courte dans le temps pourrait expliquer pourquoi nous ne détectons pas de peroxynitrite dans des cellules endothéliales stimulées avec l'Ang-II. C'est pourquoi nous avons de nouveau mesuré la formation de peroxynitrite dans des HUVECs stimulées avec l'Ang-II, en présence de nitroprusside de sodium (SNP), un donneur de  $NO^{\cdot}$ , afin de favoriser cette production (**Figure III.12C**). De nouveau, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence la formation de peroxynitrite avec la sonde HPF. Par contre, lorsque nous utilisons la sonde  $H_2DCFDA$ , moins spécifique (**Tableau I-1**), nous observons bien une production de ROS croissante en fonction du temps et cette production est fortement atténuée en présence d'acide urique. Ces résultats, bien que préliminaires, sont encourageants, car ils suggèrent qu'il y a génération de peroxynitrite, mais en quantités non détectables par la sonde HPF. Des résultats comparables ont été obtenus depuis avec les cellules EAhy926 (résultats non montrés). Enfin, pour suivre la formation de peroxynitrite en conditions plus physiologiques que le système SIN-1, il faudra peut-être à l'avenir utiliser de nouvelles sondes plus sensibles (Peng and Yang 2010) ou encore recourir à une technique électrochimique également plus sensible (Bedioui, Quinton et al. 2010).

**Dans la seconde partie de ce mémoire, nous sommes revenus au modèle de stimulation avec le SIN-1 et nous avons voulu mieux comprendre les effets protecteurs du peroxynitrite mis en évidence par Laurine Mattart dans le cadre de sa thèse et identifier les mécanismes sous-jacents à ces effets, au niveau de cellules endothéliales EAhy926 et HUVECs.**

Le peroxy-nitrite, selon les concentrations, agit de manière ambivalente, soit en tant que molécule cytotoxique à forte concentration, soit en tant que messenger secondaire à plus faible concentration. En effet, le peroxy-nitrite est connu pour entraîner des dommages à l'ADN (Burney, Caulfield et al. 1999), aux lipides (Denicola and Radi 2005) et aux protéines (Alvarez, Trujillo et al. 2002) d'une part et pour activer les voies Nrf2 (Li, Cha et al. 2006) et UPR (Mattart *et al.*, en révision) d'autre part. Comme le SIN-1 active la voie Nrf2 et induit *hmx-1*, un gène antioxydant et cytoprotecteur, Laurine Mattart (thèse de doctorat) a voulu vérifier si cette réponse cytoprotectrice pouvait protéger les cellules endothéliales. Comme indiqué à la **Figure III.13.**, nous constatons que la privation en sérum favorise l'apoptose des cellules EAhy926, mais elle semble contrecarrée dans les cellules incubées avec le SIN-1, ce qui suggère que le SIN-1 et la génération de peroxy-nitrite qui s'ensuit, favorisent la survie cellulaire dans ces conditions (Mattart *et al.*, en révision). Le peroxy-nitrite pourrait donc assurer un rôle cytoprotecteur face à une privation de sérum. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet protecteur du peroxy-nitrite dans les cellules endothéliales, nous avons analysé l'expression de différents gènes par cartes microfluidiques (**Figure III.14.**). Nos résultats confirment les effets bénéfiques induits par le peroxy-nitrite, qui favorise l'expression de nombreux gènes cytoprotecteurs, gènes cibles de la voie Nrf2 comme *hmx-1* et *Gclm* aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. De plus, le peroxy-nitrite diminue l'expression de gènes codants pour des protéines pro-athérogènes (*MCP-1* et *CSF* (1-3)). Le peroxy-nitrite diminue également l'expression de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques comme *Bax* et *Bim*, mais aucune variation n'a été constatée pour les gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques (Shacka, Sahawneh et al. 2006). Ces variations d'abondance en ARNm doivent bien sûr être confirmées au niveau protéique. Ces résultats sont en accord avec l'effet anti-apoptotique du peroxy-nitrite dans des cellules soumises à une privation de sérum (**Figure III.13.**). Nos travaux montrent donc par des tests fonctionnels, que le peroxy-nitrite peut être cytoprotecteur, en agissant en tant que messenger secondaire et en protégeant la cellule face à une privation de sérum.

Les analyses d'expression génique avec les cartes microfluidiques ont également révélé une forte induction de *CHOP*. Cette surexpression de *CHOP* a été confirmée par RT-PCR en temps réel et observée au niveau protéique. La protéine CHOP est un facteur de transcription généralement décrit comme impliqué dans la mort cellulaire déclenchée par l'UPR. La réponse UPR est une voie de signalisation intracellulaire activée par l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Cette voie a pour but d'augmenter la capacité cellulaire d'élimination de ces protéines mal repliées. Nous avons mis en évidence une activation de l'UPR (**Figure III.16.**). Cependant, lors d'un stress du RE trop intense, l'UPR peut aboutir à l'apoptose, entre autres via l'induction du facteur de transcription CHOP (**Figures III.16 et III.17.**). Actuellement, le rôle de *CHOP* est discuté, car il peut exercer des effets pro-apoptotiques (Zinszner, Kuroda et al. 1998; Woo, Cui et al. 2009) ou anti-apoptotiques (Mayerhofer and Kodym 2003) selon le type cellulaire et l'environnement. Comme *CHOP* est bien induit en présence de SIN-1, nous avons voulu vérifier si sa surexpression pouvait expliquer les effets anti-apoptotiques liés au SIN-1. Nous avons donc invalidé *CHOP* en transfectant les cellules avec des siRNA anti-*CHOP* pour déterminer son rôle dans l'effet protecteur du peroxy-nitrite (**Figures III.18., III.19 et III.20.**). L'invalidation de *CHOP* dans les cellules augmente la mort cellulaire, mais n'augmente pas la fragmentation de l'ADN. En outre, nous obtenons le même effet avec le siRNA non spécifique ce qui



suggère que CHOP ne serait pas impliqué dans les effets protecteurs du SIN-1 contre une privation de sérum.

Par ailleurs, afin d'éliminer les protéines mal repliées, l'UPR induirait l'autophagie (Kaser, Martinez-Naves et al. 2010). Plusieurs auteurs ont montré une activation de l'autophagie suite à une privation de sérum induite par un stress du RE, dans des cellules SK-N-SH, une lignée cellulaire humaine issue d'un neuroblastome (Ogata, Hino et al. 2006; Yorimitsu and Klionsky 2007). Ils ont ainsi observé qu'un stress du RE se traduit par une formation accélérée des autophagosomes (Ogata, Hino et al. 2006). En effet, en inhibant le processus autophagique, les cellules sont plus sensibles à un stress au niveau du RE, résultant en la mort cellulaire. L'autophagie semble donc impliquée dans la survie de la cellule après un stress du RE dû à une privation de sérum. Selon le type de stress et le type cellulaire, l'UPR peut induire l'autophagie via IRE1 ou PERK (Hoyer-Hansen and Jaattela 2007), XBP-1 (Hetz, Thielen et al. 2009), avec activation de TRAF2 et de la voie JNK (Ogata, Hino et al. 2006; Hoyer-Hansen and Jaattela 2007) ou encore la voie de PERK/eIF2 $\alpha$  (Fujita, Kuroku et al. 2007; Kuroku, Fujita et al. 2007). Mattart et al (en révision) ont cependant montré que dans le modèle des cellules EAhy926, la privation de sérum seule n'induisait pas d'autophagie, mais lorsqu'elle est combinée au SIN-1 on voit bien une augmentation de l'abondance de LC3-II, généralement utilisée pour estimer l'autophagie. C'est pourquoi nous nous sommes demandés s'il existait un lien entre l'induction de *CHOP* médiée par le peroxy-nitrite et l'activation du processus d'autophagie. Ayant mis au point la transfection des cellules avec des siRNA anti-*CHOP*, nous avons donc évalué les effets de cette invalidation sur la formation d'autophagosomes, via un Western blot ciblé sur la protéine LC3. Nous avons constaté la formation d'autophagosomes en présence de SIN-1. De manière surprenante, l'abondance de LC3-II observée en Western blot diminue lorsque *CHOP* est invalidé. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et doit donc être confirmée. Mais elle semble indiquer que *CHOP* empêcherait l'autophagie (**Figure III.21**). Il semble donc que la survie ou la mort des cellules EAhy926 dépende d'un équilibre subtil entre apoptose et autophagie, comme l'ont déjà proposé Mattart et al (en révision) sur base des effets observés avec des siRNA ciblant *Nrf2* et *hmx-1*. Enfin, signalons qu'outre l'invalidation de *CHOP*, celle de PERK ou ATF6 a déjà été envisagée (thèse de Laurine Mattart), mais elle pose des difficultés techniques encore non résolues.

En conclusion, le peroxy-nitrite peut exercer des effets protecteurs en activant la voie Nrf2 et la voie UPR et l'autophagie (Mattart et al, en révision). Ces effets protecteurs peuvent être mis à profit dans un modèle de privation de sérum cytotoxique augmentant l'apoptose, puisque les cellules traitées avec le SIN-1 5 mM résistent mieux à cette privation de sérum. La perspective majeure de ce travail est de mettre en évidence et de comprendre les mécanismes moléculaires qui relient la voie Nrf2, l'UPR et l'autophagie dans les cellules endothéliales exposées à du peroxy-nitrite et de définir dans quelles conditions les réponses cytoprotectrices deviennent insuffisantes, menant au dysfonctionnement endothélial.

# ANNEXE

## ANNEXE

	<b>SYMBOLE</b>	<b>NOM DU GENE</b>
	<b>ANGIOGENESE</b>	
1	NPR1	Atrial natriuretic peptide receptor 1
2	RHOB	Rho-related GTP-binding protein RhoB
3	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
	<b>APOPTOSE</b>	
4	BAK1	Bcl2 antagonist killer 1
5	BAX	Bcl2 associated X protein
6	BBC3	Bcl2 binding component 3 (PUMA)
7	BCL2	B-cell CLL/Lymphoma 2
8	BCL2L11	Bcl2 like protein 11 (BIM)
9	BIRC2	IAP2
10	DDIT3	CHOP/GADD153
11	FAS	TNF receptor superfamily member 6
12	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
13	MCL1	Apoptosis regulator MCL-1
14	PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (NOXA)
15	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B
16	TNFRSF18	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18
	<b>COAGULATION</b>	
17	F3	Tissue factor
18	NOS3	Endothelial NOS
19	PLAUR	Urokinase plasminogen activator surface receptor
20	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1
21	TFPI	Tissue factor pathway inhibitor 1
22	THBD	Thrombomodulin
	<b>ADHERENCE CELLULAIRE</b>	
23	EDN1	Endothelin-1
24	FN1	Fibronectin-1
25	ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1
26	MCAM	Cell surface glycoprotein MUC18
27	SELL	L-selectin
28	SERPINH1	Serpin H1
29	VCAM1	Vascular cell adhesion protein 1
30	VWF	Von Willebrand factor
	<b>HOUSEKEEPING GENE (HKG)</b>	
31	18S	18 S subunit ribosomal protein
32	ACTB	Actin beta
33	HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
34	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A

## ANNEXE

	<b>INFLAMMATION – Chemokines</b>	
35	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
36	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
37	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7
38	CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
39	CCR7	Chemokine (C-C motif) receptor 7
	<b>INFLAMMATION – Interleukines</b>	
40	CD14	Monocyte differentiation antigen CD14
41	CD59	CD59 glycoprotein
42	CSF2	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
43	CSF3	Granulocyte colony-stimulating factor
44	IFNG	Interferon gamma
45	IL1A	Interleukin-1 alpha
46	IL1B	Interleukin-1 beta
47	IL1RN	Interleukin-1 receptor antagonist protein
48	IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha
49	IL4	Interleukin 4
50	IL6	Interleukin 6
51	IL8	Interleukin 8
52	IL10	Interleukin 10
53	IL12B	Interleukin 12B
54	IL13	Interleukin 13
55	IL18	Interleukin 18
56	IL23A	Interleukin 23, alpha subunit p19
57	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
	<b>INFLAMMATION – autres</b>	
58	CD80	T-lymphocyte activation antigen CD80
59	CRP	C-reactive protein
60	CSF-1	Macrophage colony-stimulating factor
61	HLA-DRA	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain
62	PDGFB	Platelet-derived growth factor subunit B
63	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3
64	SAA1	Serum amyloid A protein
65	SOCS2	Suppressor of cytokine signalling 2
66	SOCS3	Suppressor of cytokine signalling 3
	<b>REPONSE ANTIOXYDANTE</b>	
67	CAT	Catalase
68	GCLM	Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit
69	HMOX1	Heme oxygenase 1
70	NFE2L2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
71	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible
72	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1
73	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
74	SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial

## ANNEXE

<b>VOIE DE SIGNALISATION DES MAPK</b>		
75	MAP2K1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
76	MAPK3	Mitogen activated protein kinase 3
77	MAPK8	Mitogen activated protein kinase 8
78	MAPK10	Mitogen activated protein kinase 10
79	MAPK14	Mitogen activated protein kinase 14
<b>FACTEURS DE TRANSCRIPTION</b>		
80	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
81	FOS	Proto-oncogene c-fos
82	JUN	Transcription factor AP-1
83	KLF2	Krueppel-like factor 2
84	KLF4	Krueppel-like factor 4
85	MYC	Myc proto-oncogene protein
86	NFKB1	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
87	NFKB2	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit
88	NFKBIA	NF-kappa-B inhibitor alpha
89	NFKBIB	NF-kappa-B inhibitor beta
90	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
91	RELA	Transcription factor p65 (NFKB3)
<b>MATRICE</b>		
92	MMP2	72 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2)
93	MMP9	Matrix metalloproteinase-9
94	TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1
<b>AUTRES</b>		
95	PDE5a	CGMP-specific 3,5'-cyclic phosphodiesterase
96	PDE11a	Dual 3',5'-cyclic-AMP and -GMP phosphodiesterase 11A
97	PTGS1	Prostaglandin G/H synthase 1

**Annexe 1 – Liste des gènes considérés pour l'analyse de l'expression par cartes microfluidiques avec leur principale fonction (pour cellules endothéliales).**

# V. BIBLIOGRAPHIE

## V. BIBLIOGRAPHIE

- Alaimo L. (mémoire BBMC 2010-2011). "Effet des LDL natives et modifiées sur les cellules endothéliales humaines EAhy926 en condition statique. Implication du facteur de transcription Nrf2".
- Alvarez, M. N., M. Trujillo, et al. (2002). "Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide." Methods Enzymol **359**: 353-366.
- Barua, R. S., J. A. Ambrose, et al. (2001). "Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation." Circulation **104**(16): 1905-1910.
- Bea, F., F. N. Hudson, et al. (2009). "Homocysteine stimulates antioxidant response element-mediated expression of glutamate-cysteine ligase in mouse macrophages." Atherosclerosis **203**(1): 105-111.
- Becker, L. B. (2004). "New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology." Cardiovasc Res **61**(3): 461-470.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, et al. (1990). "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1620-1624.
- Bedioui, F., D. Quinton, et al. (2010). "Designing molecular materials and strategies for the electrochemical detection of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in biological systems." Phys Chem Chem Phys **12**(34): 9976-9988.
- Benndorf, R., R. H. Boger, et al. (2003). "Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells." Circ Res **93**(5): 438-447.
- Benzie, I. F. and J. J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay." Anal Biochem **239**(1): 70-76.
- Bouis, D., G. A. Hospers, et al. (2001). "Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research." Angiogenesis **4**(2): 91-102.
- Bullen, C. (2008). "Impact of tobacco smoking and smoking cessation on cardiovascular risk and disease." Expert Rev Cardiovasc Ther **6**(6): 883-895.
- Burney, S., J. L. Caulfield, et al. (1999). "The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite." Mutat Res **424**(1-2): 37-49.
- Burney, S., J. C. Niles, et al. (1999). "DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite." Chem Res Toxicol **12**(6): 513-520.
- Calay, D., A. Rousseau, et al. (2010). "Copper and myeloperoxidase-modified LDLs activate Nrf2 through different pathways of ROS production in macrophages." Antioxid Redox Signal **13**(10): 1491-1502.
- Calles-Escandon, J. and M. Cipolla (2001). "Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective." Endocr Rev **22**(1): 36-52.
- Cannon, R. O., 3rd (1998). "Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium." Clin Chem **44**(8 Pt 2): 1809-1819.
- Carreras, M. C., G. A. Pargament, et al. (1994). "Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils." FEBS Lett **341**(1): 65-68.
- Cheng, Z., X. Yang, et al. (2009). "Hyperhomocysteinemia and Endothelial Dysfunction." Curr Hypertens Rev **5**(2): 158-165.
- Denicola, A. and R. Radi (2005). "Peroxynitrite and drug-dependent toxicity." Toxicology **208**(2): 273-288.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Dickhout, J. G., G. S. Hossain, et al. (2005). "Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: implications in atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2623-2629.
- Doughan, A. K., D. G. Harrison, et al. (2008). "Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction." Circ Res **102**(4): 488-496.
- Egashira, K. (2002). "Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease." Circ J **66**(6): 529-533.
- Eiserich, J. P., M. Hristova, et al. (1998). "Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils." Nature **391**(6665): 393-397.
- Eligini, S., A. Habib, et al. (2001). "Induction of cyclo-oxygenase-2 in human endothelial cells by SIN-1 in the absence of prostaglandin production." Br J Pharmacol **133**(7): 1163-1171.
- Emeis, J. J. and C. J. Edgell (1988). "Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926)." Blood **71**(6): 1669-1675.
- Fisslthaler, B., S. Dimmeler, et al. (2000). "Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress." Acta Physiol Scand **168**(1): 81-88.
- Flamant, L., S. Toffoli, et al. (2009). "Hypoxia regulates inflammatory gene expression in endothelial cells." Exp Cell Res **315**(5): 733-747.
- Forstermann, U. (2010). "Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease." Pflugers Arch **459**(6): 923-939.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113**(13): 1708-1714.
- Fujita, E., Y. Kouroku, et al. (2007). "Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II)." Hum Mol Genet **16**(6): 618-629.
- Furukawa, M. and Y. Xiong (2005). "BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase." Mol Cell Biol **25**(1): 162-171.
- Galle, J., T. Hansen-Hagge, et al. (2006). "Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells." Atherosclerosis **185**(2): 219-226.
- Gomes, A., E. Fernandes, et al. (2006). "Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review." J Fluoresc **16**(1): 119-139.
- Gunther, M. R., L. C. Hsi, et al. (1997). "Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation." J Biol Chem **272**(27): 17086-17090.
- Gustin, C., M. Van Steenbrugge, et al. (2008). "LPA modulates monocyte migration directly and via LPA-stimulated endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **295**(4): C905-914.
- Hayakawa, H. and L. Raij (1999). "Relationship between hypercholesterolaemia, endothelial dysfunction and hypertension." J Hypertens **17**(5): 611-619.
- Hetz, C., P. Thielen, et al. (2009). "XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy." Genes Dev **23**(19): 2294-2306.
- Hink, U., H. Li, et al. (2001). "Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus." Circ Res **88**(2): E14-22.
- Hoyer-Hansen, M. and M. Jaattela (2007). "Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium." Cell Death Differ **14**(9): 1576-1582.



## BIBLIOGRAPHIE

---

- Hunter, A. R. and A. J. Turner (2006). "Expression and localization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms in human endothelial cells." Exp Biol Med (Maywood) **231**(6): 718-722.
- Ide, N., T. Hirase, et al. (2008). "Angiotensin II increases expression of IP-10 and the renin-angiotensin system in endothelial cells." Hypertens Res **31**(6): 1257-1267.
- Jourd'heuil, D., F. L. Jourd'heuil, et al. (2001). "Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo." J Biol Chem **276**(31): 28799-28805.
- Kang, K. W., S. H. Choi, et al. (2002). "Peroxynitrite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transferase A2 induction." Nitric Oxide **7**(4): 244-253.
- Kaser, A., E. Martinez-Naves, et al. (2010). "Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis." Curr Opin Gastroenterol **26**(4): 318-326.
- Kim, C., J. Y. Kim, et al. (2008). "Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species." BMB Rep **41**(8): 555-559.
- Kim, R., M. Emi, et al. (2006). "Role of the unfolded protein response in cell death." Apoptosis **11**(1): 5-13.
- Ko, Y. J., J. S. Lee, et al. (2007). "Inhibitory effects of Zoagumhwan water extract and berberine on angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells." Vascul Pharmacol **47**(2-3): 189-196.
- Kouroku, Y., E. Fujita, et al. (2007). "ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation." Cell Death Differ **14**(2): 230-239.
- Landmesser, U., S. Dikalov, et al. (2003). "Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension." J Clin Invest **111**(8): 1201-1209.
- Lentz, S. R. and W. G. Haynes (2004). "Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor?" Cleve Clin J Med **71**(9): 729-734.
- Li, J., M. Ni, et al. (2008). "The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells." Cell Death Differ **15**(9): 1460-1471.
- Li, M. H., Y. N. Cha, et al. (2006). "Peroxynitrite induces HO-1 expression via PI3K/Akt-dependent activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells." Free Radic Biol Med **41**(7): 1079-1091.
- Liu, X. M., K. J. Peyton, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress stimulates heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle. Role in cell survival." J Biol Chem **280**(2): 872-877.
- Liu, Z., S. L. Huang, et al. (2009). "Inhibition of thioredoxin reductase by mansonone F analogues: Implications for anticancer activity." Chem Biol Interact **177**(1): 48-57.
- Liu, Z. B. and X. Shen (2009). "Thioredoxin reductase 1 upregulates MCP-1 release in human endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **386**(4): 703-708.
- Martin-Romero, F. J., Y. Gutierrez-Martin, et al. (2004). "Fluorescence measurements of steady state peroxynitrite production upon SIN-1 decomposition: NADH versus dihydrodichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123." J Fluoresc **14**(1): 17-23.
- Martinet, W., P. Agostinis, et al. (2009). "Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential." Clin Sci (Lond) **116**(9): 697-712.
- Mattart, L. et al. (en révision). "Peroxynitrite induces a Nrf2-dependent protective response in human endothelial cells".

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Mathy-Hartert, M., A. Mouithys-Mickalad, et al. (2000). "Effects of propofol on endothelial cells subjected to a peroxynitrite donor (SIN-1)." Anaesthesia **55**(11): 1066-1071.
- Mayer, B., A. Schrammel, et al. (1995). "Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation." J Biol Chem **270**(29): 17355-17360.
- Mayerhofer, T. and R. Kodym (2003). "Gadd153 restores resistance to radiation-induced apoptosis after thiol depletion." Biochem Biophys Res Commun **310**(1): 115-120.
- Mungrue, I. N., D. S. Bredt, et al. (2003). "From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?" Acta Physiol Scand **179**(2): 123-135.
- Navarro-Antolin, J., M. Redondo-Horcajo, et al. (2007). "Role of peroxynitrite in endothelial damage mediated by Cyclosporine A." Free Radic Biol Med **42**(3): 394-403.
- Ng, C. K., S. S. Deshpande, et al. (2002). "Adhesion of flowing monocytes to hypoxia-reoxygenation-exposed endothelial cells: role of Rac1, ROS, and VCAM-1." Am J Physiol Cell Physiol **283**(1): C93-102.
- Nossuli, T. O., R. Hayward, et al. (1998). "Mechanisms of cardioprotection by peroxynitrite in myocardial ischemia and reperfusion injury." Am J Physiol **275**(2 Pt 2): H509-519.
- Ogata, M., S. Hino, et al. (2006). "Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress." Mol Cell Biol **26**(24): 9220-9231.
- Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-389.
- Pacher, P., J. S. Beckman, et al. (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.
- Pan, P., H. Fu, et al. (2010). "Angiotensin II upregulates the expression of placental growth factor in human vascular endothelial cells and smooth muscle cells." BMC Cell Biol **11**: 36.
- Pappalardo, F., S. Musumeci, et al. (2008). "Modeling immune system control of atherogenesis." Bioinformatics **24**(15): 1715-1721.
- Peng, T. and D. Yang (2010). "HKGreen-3: a rhodol-based fluorescent probe for peroxynitrite." Org Lett **12**(21): 4932-4935.
- Petersson, A. S., H. Steen, et al. (2001). "Investigation of tyrosine nitration in proteins by mass spectrometry." J Mass Spectrom **36**(6): 616-625.
- Pfeiffer, S., K. Schmidt, et al. (2000). "Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide in vivo." J Biol Chem **275**(9): 6346-6352.
- Piqueras, L., A. R. Reynolds, et al. (2007). "Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(1): 63-69.
- Pueyo, M. E., J. F. Arnal, et al. (1998). "Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells." Am J Physiol **274**(1 Pt 1): C214-220.
- Radi, R. (2004). "Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4003-4008.
- Radi, R., A. Cassina, et al. (2002). "Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria." Biol Chem **383**(3-4): 401-409.
- Rao, R. V., E. Hermel, et al. (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." J Biol Chem **276**(36): 33869-33874.
- Reiter, C. D., R. J. Teng, et al. (2000). "Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite." J Biol Chem **275**(42): 32460-32466.
- Robinson, K. M., J. T. Morre, et al. (2004). "Triuret: a novel product of peroxynitrite-mediated oxidation of urate." Arch Biochem Biophys **423**(1): 213-217.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Rohn, T. T., L. K. Nelson, et al. (1999). "Priming of human neutrophils by peroxynitrite: potential role in enhancement of the local inflammatory response." J Leukoc Biol **65**(1): 59-70.
- Ronson, R. S., M. Nakamura, et al. (1999). "The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite." Cardiovasc Res **44**(1): 47-59.
- Rueckschloss, U., M. T. Quinn, et al. (2002). "Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(11): 1845-1851.
- Saito, S., Y. Hirata, et al. (1996). "Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT1 receptors." Hypertens Res **19**(3): 201-206.
- Schroder, M. (2008). "Endoplasmic reticulum stress responses." Cell Mol Life Sci **65**(6): 862-894.
- Seshiah, P. N., D. S. Weber, et al. (2002). "Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators." Circ Res **91**(5): 406-413.
- Setsukinai, K., Y. Urano, et al. (2003). "Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species." J Biol Chem **278**(5): 3170-3175.
- Shacka, J. J., M. A. Sahawneh, et al. (2006). "Two distinct signaling pathways regulate peroxynitrite-induced apoptosis in PC12 cells." Cell Death Differ **13**(9): 1506-1514.
- Singh, R. J., N. Hogg, et al. (1999). "The peroxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors." Arch Biochem Biophys **361**(2): 331-339.
- Sohn, H. Y., U. Raff, et al. (2000). "Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation." Br J Pharmacol **131**(4): 667-672.
- Squadrito, G. L. and W. A. Pryor (1998). "The nature of reactive species in systems that produce peroxynitrite." Chem Res Toxicol **11**(7): 718-719.
- Squadrito, G. L. and W. A. Pryor (1998). "Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide." Free Radic Biol Med **25**(4-5): 392-403.
- Stapleton, P. A., A. G. Goodwill, et al. (2010). "Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies." J Inflamm (Lond) **7**: 54.
- Tanaka, J., L. Qiang, et al. (2009). "Foxo1 links hyperglycemia to LDL oxidation and endothelial nitric oxide synthase dysfunction in vascular endothelial cells." Diabetes **58**(10): 2344-2354.
- Thorup, C., M. Kornfeld, et al. (1998). "Angiotensin-II stimulates nitric oxide release in isolated perfused renal resistance arteries." Pflugers Arch **435**(3): 432-434.
- Toffoli, S., O. Feron, et al. (2007). "Intermittent hypoxia changes HIF-1alpha phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1alpha." Biochim Biophys Acta **1773**(10): 1558-1571.
- Toffoli, S. and C. Michiels (2008). "Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours." FEBS J **275**(12): 2991-3002.
- Toffoli, S., A. Roegiers, et al. (2009). "Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1." Angiogenesis **12**(1): 47-67.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochem Cell Biol **122**(4): 339-352.
- Ungvari, Z., A. Csiszar, et al. (2002). "Impaired nitric oxide-mediated flow-induced coronary dilation in hyperhomocysteinemia: morphological and functional evidence for increased peroxynitrite formation." Am J Pathol **161**(1): 145-153.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Villa, L. M., E. Salas, et al. (1994). "Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12383-12387.
- Vladimirova-Kitova, L. G. (2008). "Asymmetric dimethylarginine--mechanisms and targets for therapeutic management." Folia Med (Plovdiv) **50**(1): 12-21.
- Wang, H. C., H. F. Zhang, et al. (2006). "Hypoxic postconditioning enhances the survival and inhibits apoptosis of cardiomyocytes following reoxygenation: role of peroxynitrite formation." Apoptosis **11**(8): 1453-1460.
- Woo, C. W., D. Cui, et al. (2009). "Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling." Nat Cell Biol **11**(12): 1473-1480.
- Xia, Y. and J. L. Zweier (1997). "Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6954-6958.
- Yamagishi, S., K. Nakamura, et al. (2005). "Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks angiotensin II signaling in endothelial cells via suppression of NADPH oxidase: a novel anti-oxidative mechanism of PEDF." Cell Tissue Res **320**(3): 437-445.
- Yang, S. Y., J. W. Huang, et al. (2005). "Factors associated with increased plasma homocysteine in patients using an amino acid peritoneal dialysis fluid." Nephrol Dial Transplant **20**(1): 161-166.
- Yasmin, W., K. D. Strynadka, et al. (1997). "Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts." Cardiovasc Res **33**(2): 422-432.
- Yorimitsu, T. and D. J. Klionsky (2007). "Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy." Autophagy **3**(2): 160-162.
- Zhang, C., Y. Cai, et al. (2001). "Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response." J Biol Chem **276**(38): 35867-35874.
- Zhang, H., A. Schmeisser, et al. (1999). "Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH/NADPH-oxidases." Cardiovasc Res **44**(1): 215-222.
- Zhang, X., H. Li, et al. (2000). "Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production." Am J Physiol Renal Physiol **279**(4): F671-678.
- Zhou, J. L., G. H. Jin, et al. (2003). "Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats." World J Gastroenterol **9**(6): 1318-1322.
- Zinszner, H., M. Kuroda, et al. (1998). "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum." Genes Dev **12**(7): 982-995.
- Zmijewski, J. W., A. Landar, et al. (2005). "Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1385-1389.
- Zmijewski, J. W., D. R. Moellering, et al. (2005). "Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(2): H852-861.
- Zou, M. H. and M. Bachschmid (1999). "Hypoxia-reoxygenation triggers coronary vasospasm in isolated bovine coronary arteries via tyrosine nitration of prostacyclin synthase." J Exp Med **190**(1): 135-139.